



**Universidade Nova de Lisboa**

**Instituto de Higiene e Medicina Tropical**

Estudo do perfil epidemiológico molecular de *Giardia duodenalis* em crianças dos 0 aos 59 meses de idade no Hospital Central de Nampula e sua associação com o estado nutricional, diarreia e VIH.

**Filipa Santana Ferreira**

DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS  
BIOMÉDICAS, ESPECIALIDADE DE PARASITOLOGIA

(MARÇO, 2017)





**Universidade Nova de Lisboa**

**Instituto de Higiene e Medicina Tropical**

Estudo do perfil epidemiológico molecular de *Giardia duodenalis* em crianças dos 0 aos 59 meses de idade no Hospital Central de Nampula e sua associação com o estado nutricional, diarreia e VIH.

**Autor:** Filipa Santana Ferreira

Licenciada em Biologia Microbiana e Genética

Mestre em Doenças Infeciosas Emergentes

**Orientador:** Professora Doutora Filomena da Luz Martins Pereira (IHMT/UNL)

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Filomena Martins Pereira. Apoio financeiro da Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT), com a bolsa de doutoramento SFRH/BD/69567/2010.

(MARÇO, 2017)



*Sem firmeza e tenacidade, a teoria do projeto*

*jamais deixará o sonho do vir-a-ser...*

*(Emmanuel)*



*À minha Família*





## **Agradecimentos**

A realização deste projeto apenas foi possível através do contributo de várias pessoas às quais gostaria de agradecer.

O meu primeiro agradecimento é dirigido à Professora Doutora Sónia Lima cujo entusiasmo e perseverança foram fundamentais para que este projeto passasse da teoria à prática. Agradeço-lhe também por me ter acompanhado ao longo de todos estes anos incentivando-me sempre a melhorar as minhas capacidades enquanto investigadora. Mas mais do que isso pela sua amizade e por todos os momentos partilhados. Na minha tese de mestrado agradeço-lhe por ter a porta do seu gabinete sempre aberta. Hoje ela está fechada, mas a do seu coração continua aberta! Obrigada.

Ao Professor Doutor Jorge Atougua pela sua disponibilidade permanente, pela sua boa disposição, pela partilha das suas aventuras e sabedoria.

À Professora Filomena Pereira que me acolheu com tanto carinho e me conduziu nos últimos passos desta jornada. Pela tranquilidade e segurança que sempre me transmitiu.

À Professora Doutora Maria do Rosário por toda a sua ajuda e esclarecimentos na análise estatística dos resultados deste estudo.

Ao CMDT pelo apoio financeiro concedido.

À Ana Valente, Carla Ganhão, Sandrinhe Cunha, Sofia Costa, Bruno Belchior, Diogo Rodrigues, Francisco Carpinteiro, Paulo, Rui Henriques e Simão Dias amigos incondicionais nas minhas aventuras em Nampula. A minha família em Moçambique.

Às minhas amigas mais longínquas: Liliana, Taia, Raquel, Rita e Sílvia que me acompanham continuamente, em qualquer circunstância.

À Ana Maria, Dinamene e Joana Gomes que permaceram sempre a meu lado apesar das longas distâncias que por vezes nos separaram.

Ao Nuno Rolão e ao Rúben que mesmo quando deixaram de estar presentes continuaram a ser os amigos de sempre.

À Daniela Portugal, Sónia Pestana e Ana Reis pelos momentos de alegria partilhados e pelo carinho que sempre me deram.

À Carla Costa e à sua família por me ter recebido com um dos seus.

Aos inúmeros médicos, estudantes de medicina, enfermeiros, técnicos de análise, administrativos, e outros colaboradores do Hospital Central de Nampula com quem fui conctatando no decorrer do processo da colheita de amostras. Mas um agradecimento especial para toda a equipa das consultas externas: Cármem, Cristésia, Dona Deolinda, Dona Fátima, Ana, Amélia, Enfermeira Abiba, Enfermeira Emília, Enfermeira Etelvina e Enfermeira Mariamo. Por todos os momentos partilhados, por toda a ajuda, paciência, colaboração e afeto com que me receberam e envolveram até ao dia da minha partida. E não poderia esquecer-me de mencionar a equipa do Laboratório do Hospital Central de Nampula, mas em particular o Técnico Tito com quem partilhei o microscópio.

À Doutora Ana Rosa Araújo por ter facilitado a realização deste estudo no Hospital Central de Nampula e pela sua disponibilidade.

Às irmãs da “Casa da Alegria” que me acolheram e proporcionaram muitos momentos de pura alegria numa cidade onde é difícil sorrir.

À minha família, que continua a ser o meu porto de abrigo.

Ao Luca pelo seu amor incondicional e pela sua dedicação constante que me fazem sentir abençoada e privilegiada, num mundo onde existem tantos desenganos e ilusões.

O meu último agradecimento é envolvido com imensa ternura e saudade a todas as mães, pais, avós, tios e tias que aderiram a este estudo. Mas mais do que isso, que partilharam as suas histórias, que me convidaram para as suas casas e que me presentearam com aquilo que tinham e não tinham.

## Resumo

**Estudo do perfil epidemiológico molecular de *Giardia duodenalis* em crianças dos 0 aos 59 meses de idade no Hospital Central de Nampula e sua associação com o estado nutricional, diarreia e VIH.**

**Filipa Santana Ferreira**

**Palavras-chave:** *Giardia duodenalis*, genótipos, crianças, hospital, Moçambique.

A giardíase é uma doença causada pelo protozoário intestinal *Giardia duodenalis*. Esta doença tem uma distribuição ubíqua e afeta todos os grupos etários apesar de apresentar uma maior incidência nos países de baixo e médio rendimento, bem como em crianças. Este protozoário intestinal inclui oito genótipos (A-H), dos quais apenas A e B são infecciosos para o homem. Vários estudos têm sido realizados no sentido de esclarecer a sua relação com a gravidade da doença diarreica. No entanto, existem poucas publicações onde se explora a sua associação com o estado nutricional e menos ainda com a infeção pelo VIH, em crianças com menos de cinco anos de idade.

Este trabalho teve como objetivo principal o estudo da associação entre a infeção por *G. duodenalis* e o estado nutricional, diarreia e infeção pelo VIH em crianças dos 0 aos 59 meses de idade no Hospital Central de Nampula (HCN), Moçambique. Para tal, foram incluídas 831 crianças internadas ou assistidas nas consultas externas do HCN, das quais se obteve uma amostra de fezes, os seus dados socio-demográficos, clínicos e antropométricos (comprimento/estatura e peso). A análise parasitológica de fezes foi efetuada por exame direto e concentração de Ritchie e a deteção de antígeno de *G. duodenalis* por teste imunocromatográfico rápido. As amostras com identificação positiva para *G. duodenalis* em qualquer um dos métodos foram conservadas para posterior extração de DNA e análise molecular. A caracterização genotípica foi realizada através do estudo de polimorfismos únicos de posição para o gene da  $\beta$ -giardina (*bg*), tendo sido realizada a análise estatística através da regressão logística binária e regressão logística múltipla.

O diagnóstico parasitológico revelou que *G. duodenalis* foi o parasita intestinal mais comum na população estudada (23,9%, 199/831). Os resultados obtidos não demonstraram nenhuma associação estatisticamente significativa entre o estado nutricional, diarreia ou infeção pelo VIH e a infeção pelos genótipos de *G. duodenalis*. No entanto, verificou-se que as crianças que viviam em habitações com três ou mais pessoas por divisão eram mais suscetíveis à infeção total e simples por *G. duodenalis* ( $p=0,034$  e  $p=0,048$ , respetivamente). Em relação ao estado nutricional observou-se que as crianças com infeção simples por *G. duodenalis* apresentavam uma menor probabilidade de terem desnutrição aguda ( $p=0,041$ ). Para além disso, as crianças com idades inferiores a 24 meses pareciam ser mais suscetíveis a terem desnutrição por baixo-peso e aguda, a apresentarem diarreia, dor abdominal e falta de apetite ( $p<0,05$ ).

Este estudo evidencia a importância do diagnóstico deste protozoário em contextos semelhantes, bem como a necessidade de mais contributos para o esclarecimento do papel dos genótipos de *G. duodenalis* no estado de saúde infantil. Outro aspeto relevante inclui uma melhor compreensão sobre o impacto da infeção em crianças com menos de cinco anos de idade com desnutrição aguda.



## Abstract

**Study of the molecular epidemiological profile of *Giardia duodenalis* in children aged 0-59 months at the Central Hospital of Nampula and its association with nutritional status, diarrhea and HIV.**

**Filipa Santana Ferreira**

**Key words:** *Giardia duodenalis*, genotypes, children, hospital, Mozambique

Giardiasis is a disease caused by the intestinal protozoa *Giardia duodenalis*. This disease has an ubiquitous distribution and affects all age groups, despite having a higher incidence in low- and middle-income countries, as well as in children. This intestinal protozoan includes eight genotypes (A-H), of which only A and B are infectious to humans. Several studies have been carried out in order to clarify their relationship with the severity of diarrheal disease. However, the number of publications exploring its association with nutritional status is small and fewer related to HIV infection in children under five years of age.

This study aimed to explore the association between infection with *G. duodenalis* and nutritional status, diarrhea and HIV infection in children aged 0-59 months at the Central Hospital of Nampula (HCN), Mozambique. For this purpose, 831 children hospitalized or attending the HCN outpatient clinic were included. One single stool sample was obtained from each child. In addition, socio-demographic, clinical and anthropometric data (length/height and weight) were also obtained. Parasitological analysis of feces was performed through direct examination and Ritchie concentration technique and *G. duodenalis* antigen detection by rapid immunochromatographic test. Samples with positive identification of *G. duodenalis* with any of these methods were stored until DNA extraction and molecular analysis were conducted. Genetic characterization was done by studying a single nucleotide position polymorphism for the  $\beta$ -giardin gene (*bg*). Statistical analysis was undertaken through binary logistic regression and multiple logistic regression.

The parasitological diagnosis revealed that *G. duodenalis* was the most common intestinal parasite in the studied population (23.9%, 199/831). The results of this study did not demonstrate any statistically significant association between nutritional status, diarrhea or HIV infection and *G. duodenalis* genotypes infection. However, it was found that children living in houses with three or more persons per room were more susceptible to total and simple infection with *G. duodenalis* ( $p=0.034$  and  $p=0.048$ , respectively). Regarding nutritional status, it was observed that children with simple infection by *G. duodenalis* were less likely to have acute malnutrition ( $p=0.041$ ). In addition, children younger than 24 months appeared to be more susceptible to low-weight and acute malnutrition, having diarrhea, abdominal pain and lack of appetite ( $p<0.05$ ).

This study highlights the importance of the diagnosis of this protozoan in similar contexts, as well as the need for more contributions to clarify the role of *G. duodenalis* genotypes in child health. Another relevant aspect includes a better understanding of the impact of infection in children under five years of age with acute malnutrition.



## Índice

Índice de Figuras .....	xv
Índice de Tabelas .....	xvii
Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos .....	xxi
<b>1 Introdução .....</b>	<b>1</b>
1.1 Enquadramento .....	3
1.2 Parasitas intestinais .....	5
1.3 <i>Giardia duodenalis</i> .....	6
1.3.1 Taxonomia .....	7
1.3.2 Agente etiológico e transmissão.....	8
1.3.3 Importância da giardíase na saúde pública.....	10
1.3.4 Manifestações clínicas .....	11
1.3.5 Diagnóstico .....	12
1.3.6 Tratamento .....	17
1.3.7 Epidemiologia molecular .....	18
1.3.8 Genótipos de <i>G. duodenalis</i> e quadro clínico da doença .....	19
1.4 Relevância e objetivos do estudo .....	26
<b>2 Material e Métodos .....</b>	<b>27</b>
2.1 Desenho do estudo .....	29
2.2 Caracterização da área em estudo .....	31
2.3 Determinação do tamanho da amostra .....	32
2.4 Questionários sociodemográficos e clínico.....	32
2.5 Determinação do estado nutricional.....	33
2.6 Diagnóstico parasitológico.....	33
2.6.1 Exame microscópico .....	33
2.6.2 Detecção de antígeno de <i>G. duodenalis</i> .....	34
2.7 Análise molecular de <i>G. duodenalis</i> .....	34
2.7.1 Extração de DNA .....	35
2.7.2 Amplificação de fragmentos de DNA de <i>G. duodenalis</i> por PCR.....	36
2.7.3 Purificação e sequenciação de DNA .....	37
2.7.4 Análise de polimorfismo de posição (SNPs).....	38
2.8 Tratamento dos dados e análise estatística.....	38
<b>3 Resultados .....</b>	<b>41</b>

3.1	Caracterização sociodemográfica .....	43
3.2	Avaliação nutricional .....	49
3.3	Dados clínicos .....	51
3.4	Diagnóstico parasitológico .....	54
3.5	Análise molecular de <i>G. duodenalis</i> .....	57
3.6	Estudos de associação .....	66
3.6.1	Infeção por <i>G. duodenalis</i> .....	66
3.6.2	Desnutrição .....	78
3.6.3	Sintomatologia .....	80
3.7	Modelos de regressão multivariada .....	85
4	<i>Discussão e Conclusões</i> .....	93
5	<i>Referências bibliográficas</i> .....	107
<i>Anexo II</i> .....		133
<i>Anexo III</i> .....		139
<i>Anexo IV</i> .....		143



## Índice de Figuras

Figura 1.1 Taxonomia de <i>G. duodenalis</i> (adaptado de (27)).	7
Figura 1.2 Ciclo de vida de <i>G. duodenalis</i> (adaptado de (40)).	10
Figura 1.3 Distribuição geográfica dos genótipos A e B de <i>G. duodenalis</i> (adaptado de (12)).	19
Figura 1.4 Tipos de desnutrição (adaptado de (109)).	23
Figura 1.5 Interação entre a malnutrição e infeção (adaptado de (2)).	24
Figura 2.1 Fluxograma do estudo.	30
Figura 2.2 Localização geográfica da província de Nampula em Moçambique e mapa da província de Nampula com os respectivos distritos (141).	31
Figura 2.3 Fluxograma do processamento das amostras com identificação positiva para <i>G. duodenalis</i> .	35
Figura 3.1 Imagens representativas dos blocos de matope e tipo de habitações mais comuns no distrito de Nampula: a) bloco de matope; b) palhota; c) casa com telhado de chapa de zinco.	45
Figura 3.2 Imagens representativas das latrinas de fossa aberta (a) e melhorada (b).	48
Figura 3.3 Imagem representativa do local de despejo dos resíduos sólidos urbanos: a) ar livre e b) contentor.	48
Figura 3.4 Gráfico representativo da percentagem total de infeções por parasitas intestinais patogénicos e da infeção por <i>G. duodenalis</i> (microscopia e TDR), <i>S. stercoralis</i> e <i>Cryptosporidium</i> sp., de acordo com o ano e época de colheita das amostras de fezes.	57
Figura 3.5 Fluxograma da análise das amostras de fezes com identificação positiva para <i>G. duodenalis</i> , desde a microscopia (Mic) e utilização de testes de deteção rápida (TDR) à análise molecular (PCR <i>ssurRNA</i> e <i>bg</i> ) e consequente genotipagem.	58



## Índice de Tabelas

Tabela 1.1 Espécies de <i>Giardia</i> e genótipos de <i>G. duodenalis</i> (adaptado de (6)).....	8
Tabela 1.2 Lista de <i>loci</i> genéticos utilizados para genotipagem, sua função e disponibilidade de informação a partir de diferentes espécies de <i>Giardia</i> ou de grupos genéticos de <i>G. duodenalis</i> (adaptado de (38)). .....	15
Tabela 1.3 Doses de fármacos recomendadas para o tratamento da giardíase em adultos e crianças e respetiva eficácia (adaptado de (37)). .....	18
Tabela 1.4 Associação entre os genótipos de <i>G. duodenalis</i> a gravidade da diarreia e outros sintomas (adaptado de (12)). .....	21
Tabela 2.1 Condições de amplificação utilizadas para os genes <i>ssurRNA</i> e <i>bg</i> . .....	37
Tabela 2.2 Variáveis dependentes e variáveis independentes para as quais foi explorada a associação com <i>G. duodenalis</i> . .....	39
Tabela 3.1 Caraterísticas gerais das crianças incluídas no estudo: frequências relativas (%); frequências absolutas (n) e intervalos de confiança a 95% (IC95%). .....	43
Tabela 3.2 Escolaridade dos pais: frequências relativas (%); frequências absolutas (n) e intervalos de confiança a 95% (IC95%). .....	44
Tabela 3.3 Caraterísticas habitacionais: frequências relativas (%); frequências absolutas (n) e intervalos de confiança a 95% (IC95%). .....	46
Tabela 3.4 Acesso e tratamento da água de consumo: frequências relativas (%); frequências absolutas (n) e intervalos de confiança a 95% (IC95%). .....	47
Tabela 3.5 Condições de higiene e saneamento: frequências relativas (%); frequências absolutas (n) e intervalos de confiança a 95% (IC95%). .....	49
Tabela 3.6 Aleitamento materno e dados antropométricos das crianças incluídas no estudo: frequências relativas (%); frequências absolutas (n) e intervalos de confiança a 95% (IC95%). BP – baixo peso, DC – desnutrição crónica, DA – desnutrição aguda. ....	50
Tabela 3.7 Diarreia e desparasitação nas crianças incluídas no estudo: frequências relativas (%); frequências absolutas (n) e intervalos de confiança a 95% (IC95%). .....	52
Tabela 3.8 Outros sintomas e sinais além da diarreia: frequências relativas (%); frequências absolutas (n) e intervalos de confiança a 95% (IC95%). .....	53
Tabela 3.9 Infecção pelo VIH e outras patologias: frequências relativas (%); frequências absolutas (n) e intervalos de confiança a 95% (IC95%). .....	54

Tabela 3.10 Tipo de infecção e tipo de parasitas intestinais patogênicos diagnosticados: frequências relativas (%); frequências absolutas (n) e intervalos de confiança a 95% (IC95%).	55
Tabela 3.11 Parasitas intestinais patogênicos identificados: frequências relativas (%); frequências absolutas (n) e intervalos de confiança a 95% (IC95%).	55
Tabela 3.12 Substituições nucleotídicas no gene <i>bg</i> para os isolados do genótipo A de <i>G. duodenalis</i> , de acordo com as posições polimórficas descritas por Cacciò et al (2008). Y= C/T; R=A/G.	59
Tabela 3.13 Substituições nucleotídicas no gene <i>bg</i> para os isolados do genótipo B de <i>G. duodenalis</i> , de acordo com as posições polimórficas descritas por Cacciò et al (74). Y= C/T ..	60
Tabela 3.14 Substituições nucleotídicas no gene <i>bg</i> para os isolados do genótipo B de <i>G. duodenalis</i> identificadas neste estudo.	63
Tabela 3.15 Exploração da associação entre a variável dependente infecção total por <i>G. duodenalis</i> (simples e mista) e as variáveis independentes, grupo etário, sexo e estado do aleitamento materno no momento do estudo.	66
Tabela 3.16 Exploração da associação entre a variável dependente infecção total por <i>G. duodenalis</i> (simples e mista) e as variáveis independentes, escolaridade da mãe e escolaridade do pai.	67
Tabela 3.17 Exploração da associação entre a variável dependente infecção total por <i>G. duodenalis</i> (simples e mista) e as variáveis independentes, fonte de água de consumo, tratamento da água, saneamento e resíduos sólidos urbanos (RSU).	68
Tabela 3.18 Exploração da associação entre a variável dependente infecção total por <i>G. duodenalis</i> (simples e mista) e as variáveis independentes, número de divisões da habitação e densidade de pessoas na habitação (número de pessoas por divisão).	69
Tabela 3.19 Exploração da associação entre a variável dependente infecção total por <i>G. duodenalis</i> (simples e mista) e a variável independente infecção pelo VIH.	70
Tabela 3.20 Exploração da associação entre a variável dependente infecção simples por <i>G. duodenalis</i> e as variáveis independentes, grupo etário, sexo e estado do aleitamento materno no momento do estudo.	71
Tabela 3.21 Exploração da associação entre a variável dependente infecção simples por <i>G. duodenalis</i> e as variáveis independentes, escolaridade da mãe e escolaridade do pai.	72
Tabela 3.22 Exploração da associação entre a variável dependente infecção simples por <i>G. duodenalis</i> e as variáveis independentes, fonte de água de consumo, tratamento da água, saneamento e resíduos sólidos urbanos (RSU).	73

Tabela 3.23 Exploração da associação entre a variável dependente infecção simples por <i>G. duodenalis</i> e as variáveis independentes, número de divisões da habitação e densidade de pessoas na habitação (número de pessoas por divisão).....	74
Tabela 3.24 Exploração da associação entre a variável dependente infecção simples por <i>G. duodenalis</i> e a variável independente infecção por VIH. ....	75
Tabela 3.25 Exploração da associação entre a variável dependente infecção pelo genótipo A e as variáveis independentes, grupo etário, sexo das crianças, densidade de pessoas na habitação e infecção pelo VIH. ....	76
Tabela 3.26 Exploração da associação entre a variável dependente infecção pelo genótipo B e as variáveis independentes, grupo etário, sexo das crianças, densidade de pessoas na habitação e infecção pelo VIH. ....	77
Tabela 3.27 Exploração da associação entre as variáveis dependentes, baixo peso, desnutrição crónica e aguda, e as variáveis infecção total, simples e pelos genótipos A e B de <i>G. duodenalis</i> . ....	78
Tabela 3.28 Exploração entre as variáveis dependentes, diarreia, duração da diarreia (dias), número de dejeções por dia e apresentação de diarreia aquosa e as variáveis infecção total, simples e pelos genótipos A e B de <i>G. duodenalis</i> . ....	80
Tabela 3.29 Exploração entre as variáveis dependentes, vômitos, febre, dor abdominal e falta de apetite e as variáveis infecção total, simples e pelos genótipos A e B de <i>G. duodenalis</i> . ....	83
Tabela 3.30 Modelo de regressão multivariada para a infecção total por <i>G. duodenalis</i> , tendo como variáveis independentes o grupo etário, sexo, aleitamento materno e densidade de pessoas na habitação.....	86
Tabela 3.31 Modelo de regressão multivariada para a infecção simples por <i>G. duodenalis</i> , tendo como variáveis independentes o grupo etário, sexo e o aleitamento materno e densidade de pessoas na habitação. ....	87
Tabela 3.32 Modelo de regressão multivariada para a desnutrição por baixo peso, tendo como variáveis independentes o grupo etário, sexo e infecção simples por <i>G. duodenalis</i> . ....	88
Tabela 3.33 Modelo de regressão multivariada para a desnutrição aguda, tendo como variáveis independentes o grupo etário, sexo e infecção total e simples por <i>G. duodenalis</i> .....	89
Tabela 3.34 Modelo de regressão multivariada para a diarreia, tendo como variáveis independentes o grupo etário, sexo e a infecção total por <i>G. duodenalis</i> . ....	90
Tabela 3.35 Modelo de regressão multivariada para o sintoma dor abdominal, tendo como variáveis independentes o grupo etário, sexo e a infecção total por <i>G. duodenalis</i> .....	91

Tabela 3.36 Modelo de regressão multivariada para o sintoma falta de apetite, tendo como variáveis independentes o grupo etário, sexo, e infecção total e simples por *G. duodenalis*..... 92

## Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos

*5.8SrDNA* – do inglês *5.8S ribosomal DNA*

*18S rRNA* – do inglês *18S ribosomal RNA*

A – adenina

ASH – do inglês *allelic sequence heterozygosity*

*bg* - β-giardina

BP – baixo peso

C – citosina

C4 – Fase de leitura aberta C4

CD4<sup>+</sup> - do inglês *cluster of differentiation 4*

CH – Consulta externa de VIH

CM – Consulta externa da Malnutrição

DA – desnutrição aguda

DC – desnutrição crónica

DNA – do inglês *deoxyribonucleic acid*

ED – Enfermaria das Diarreias

*ef1-α* – do inglês *elongation factor 1-alfa*

EIZ - comprimento/estatura para a idade

ELISA – do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

EM – Enfermaria da Malnutrição

ENA – do inglês *Emergency Nutrition Assessment*

G – guanina

*gdh* – glutamato desidrogenase

HCN – Hospital Central de Nampula

IC – Intervalo de confiança

*IGSrDNA* – do inglês *intergenic spacer of ribosomal DNA*

IHMT – Instituto de Higiene e Medicina Tropical

ITS – do inglês *internal transcribed spacer*

Mic – Microscopia

*mlh1* – do inglês *mutL-homolog*

n.a. – não aplicável

OMS – Organização Mundial de Saúde

OR – do inglês *Odds Ratio*

ORa – *Odds Ratio* ajustado

ORb – *Odds Ratio* bruto

pb – pares de bases

PCR – do inglês *polymerase chain reaction*

PEZ - peso para a comprimento/estatura

PIZ - peso para a idade

RSU – resíduos sólidos urbanos

SETSAN - Secretariado Técnico de Segurança Alimentar e Nutricional

SIDA - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

SNP – Polimorfismo de posição única

SPSS – do inglês *Statistical Package for Social Sciences*

*ssurRNA* - Pequena subunidade do RNA ribossomal

T - timina

TARV – terapia antirretroviral

TDR – teste de detecção rápida

*tpi* – triosefosfato isomerase

UNICEF – do inglês *United Nations Children's Fund*

UV – ultravioleta

VIH - Vírus da Imunodeficiência Humana



# ***1 Introdução***



## 1.1 Enquadramento

Os protozoários intestinais são responsáveis por doenças que ocasionam uma morbilidade significativa em crianças, originando ainda doenças oportunistas em indivíduos com o Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), conduzindo ou agravando estados de imunodepressão. Nos países de baixo e médio rendimento a malnutrição é frequente em crianças, muitas vezes como consequência de infeções parasitárias, tornando-as mais suscetíveis a sofrerem de episódios diarreicos graves e repetidos (1).

A malnutrição é um estado que torna o indivíduo mais suscetível à infeção e, por sua vez, a infeção contribui para a mesma, estabelecendo-se uma relação bidireccional (2). A malnutrição é a causa primária de imunodeficiência a nível mundial, sendo as crianças, adolescentes e idosos os grupos mais afetados. Existe uma relação íntima entre este estado, infeção e mortalidade infantil, uma vez que uma nutrição deficiente contribui para o baixo peso, enfraquecimento e vulnerabilidade a infeções, principalmente devido ao desenvolvimento de inflamação e lesões do epitélio intestinal que comprometem a sua integridade (2).

A diarreia é uma causa importante de morbilidade e mortalidade em crianças, nomeadamente nos países de baixo e médio rendimento. Crianças com idades inferiores a cinco anos de idade têm cerca de 3,3 episódios de diarreia por ano e mais de um terço das mortes neste grupo etário estão associadas à diarreia. Assim, anualmente cerca de 1,5 mil milhões de episódios diarreicos e quatro milhões de mortes em crianças com menos de cinco anos de idade (a maioria entre os seis meses e os 12 anos) ocorrem por este motivo (3). Por outro lado, tem sido relatado que a diarreia é um problema clínico importante entre os doentes com VIH (Vírus da Imunodeficiência Humana), associado a uma perturbação significativa da qualidade de vida dos mesmos (4).

Entre os diversos agentes patogénicos responsáveis pela etiologia da diarreia encontram-se os enteroparasitas, com especial relevância para os protozoários intestinais. *Giardia duodenalis* é um desses agentes patogénicos causando a giardíase. Esta doença é caracterizada por quadros de diarreia aguda ou crónica ou pode permanecer assintomática (5). Além disso, parece ter um efeito prejudicial no crescimento e desenvolvimento infantil (5,6).

*G. duodenalis* apresenta variações intra-específicas que levaram ao

estabelecimento de diferentes genótipos, de acordo com diferenças observadas a nível genético (7). Atualmente são considerados oito genótipos (A-H), dos quais apenas os genótipos A e B são conhecidos por provocarem infeção no homem. No entanto, existe alguma controvérsia em relação às consequências da infeção pelos vários genótipos (8–11). Estes parecem ter diferentes efeitos na gravidade da infeção no homem, apesar de não existir uma concordância entre os estudos publicados alguns autores defendem que o genótipo A está associado a uma forma mais grave da giardíase, enquanto outros atribuem a gravidade ao genótipo B tal como descrito na secção 1.3.8.1 (12).

Globalmente, o quadro epidémico do distrito de Nampula é dominado pela malária, diarreia, infeções sexualmente transmitidas e SIDA que, no seu conjunto, representam quase a totalidade dos casos de doenças notificados no distrito (13).

De acordo com as autoridades de saúde Moçambicanas, as províncias que apresentavam um perfil epidemiológico mais preocupante em termos de parasitoses intestinais (geohelmintoses) incluíam Niassa (51,4%), Cabo Delgado (59,9%) e Nampula (62,0%) (14). Sustentando esta informação, o Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF) (2003) considerou que Nampula, juntamente com as províncias de Cabo Delgado e Maputo apresentavam as maiores prevalências de diarreia em crianças com menos de cinco anos de idade (15).

Segundo o “Inquérito Nutricional Rápido” realizado pelo Ministério da Saúde de Moçambique em 2005, Nampula encontrava-se entre as províncias com as prevalências mais elevadas de baixo peso-para-comprimento/estatura (desnutrição aguda) e da baixa comprimento/estatura-para-altura (desnutrição crónica). Para além disso, este inquérito revelou também que 37,3% das crianças tiveram diarreia nos 15 dias anteriores ao inquérito, com uma prevalência mais alta na faixa etária dos 6-23 meses (16).

Em relação à epidemia do VIH/SIDA foi descrita uma prevalência de 4,7% em 2000 para a província de Nampula. Este valor quase que duplicou, atingindo os 8,5% em 2007 (17).

A maioria dos dados sobre a prevalência de parasitoses intestinais provém de estudos realizados a nível da comunidade com indivíduos assintomáticos e não no contexto hospitalar. Muitos hospitais nos países de baixo e médio rendimento não possuem laboratórios de microbiologia clínica, pelo que as causas da diarreia infantil permanecem desconhecidas em muitas regiões (3).

Dados preliminares, resultantes dum estudo conduzido no âmbito duma tese de mestrado intitulada “Parasitas Intestinais em Crianças Internadas dos 0 aos 59 meses, com Desnutrição Severa, no Hospital Central de Nampula, Moçambique”, que incluiu uma amostra de 189 crianças, revelaram que 36,5% (69/189) apresentavam diarreia, 29,1% (55/189) estavam infetadas pelo VIH e 22,8% (43/189) com parasitas intestinais. Relativamente à infeção por parasitas intestinais, nomeadamente protozoários, observou-se uma frequência de 11,1% (21/189) de crianças parasitadas com *G. duodenalis* (18). Por outro lado, um estudo conduzido a nível nacional em crianças em idade escolar determinou uma prevalência de *G. duodenalis* de 19,0% (14).

No âmbito das parasitoses intestinais, em especial no que se refere às protozooses, este estudo poderá contribuir para uma melhor compreensão do seu impacto na saúde infantil das crianças moçambicanas, com especial relevância no estado nutricional, diarreia e infeção pelo VIH.

## **1.2 Parasitas intestinais**

Ao longo da evolução do planeta, cerca de 300 espécies de helmintas e mais de 70 espécies de protozoários adquiriram a capacidade de parasitar o homem. Apesar da maioria destes parasitas serem raros ou acidentais, os seres humanos ainda assim podem ser infetados por cerca de 90 espécies consideradas relativamente comuns. Ao longo do tempo a distribuição das parasitoses humanas foi bastante afetada pelas atividades do homem e nos últimos anos pelo advento da SIDA (19).

No seu conjunto, os helmintas compreendem os agentes infecciosos mais comuns que afetam o homem nos países de baixo e médio rendimento. As helmintoses mais comuns são as geohelmintoses, nomeadamente as causadas pelos parasitas *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* e ancilostomatídeos (*Necator americanus* e *Ancylostoma duodenale*), seguidos pela schistosomose e filariose linfática. De um modo geral, nestes países o impacto conjunto das doenças provocadas por helmintas rivaliza com as doenças de elevada mortalidade como o VIH/SIDA ou a malária (20–22).

Desde a publicação da obra “This wormy world” de Norman Stoll em 1947 (23), onde o profundo impacto das infeções causadas pelos nemátodos foi evidenciado, vários esforços globais têm sido feitos no sentido de se compreender os efeitos dos helmintas

na saúde humana. Estima-se que mais de mil milhões de pessoas que habitam em regiões de baixo e médio rendimento da África subsariana, Ásia e Américas se encontram infetadas por uma ou mais espécies de helmintas (24,25). A morbilidade associada à maioria das doenças helmínticas está intimamente relacionada com a pobreza; elas resultam das condições de pobreza e contribuem marcadamente para a pobreza. Entre outros aspetos prejudicam a produtividade agrícola e económica, e são prejudiciais para o desenvolvimento cognitivo e educacional, dificultando assim o crescimento socio-económico. Para além disso, as próprias infeções podem acentuar o efeito de outros agentes patogénicos como no caso da malária e do VIH e enfraquecer a resposta às vacinas (22).

Negligenciadas, em detrimento das infeções intestinais helmínticas, as infeções causadas por protozoários são igualmente comuns. Estas infeções apresentam uma distribuição mundial e o seu impacto é maior em crianças, grávidas e em indivíduos imunocomprometidos pelo VIH/SIDA. A morbilidade e mortalidade associadas às infeções por protozoários intestinais são bastante elevadas, com cerca de 58 milhões de casos de diarreia em crianças anualmente (26).

### **1.3 *Giardia duodenalis***

Devido ao seu tamanho reduzido, os protozoários intestinais só foram reconhecidos após a invenção do microscópio por Antoine van Leeuwenhoek, nos finais do século XVII. Este mesmo cientista foi o responsável pela descoberta de *G. duodenalis* em 1681, sendo este o primeiro protozoário a ser descrito no homem (19). Contudo, este parasita recebeu pouca atenção e apenas em 1902 o parasitologista americano Charles Wardell Stiles suspeitou duma relação causal entre *G. duodenalis* e diarreia (19). Em 1926, em Londres, o médico Reginald Miller demonstrou de forma conclusiva que algumas crianças infetadas por *Giardia* sofriam de malabsorção, enquanto outras eram portadoras assintomáticas (19). Apenas em 1954 os estudos detalhados realizados pelo médico americano Robert Rendtorff produziram evidências sólidas que ligavam este protozoário com a doença (19). Hoje em dia, *G. duodenalis*, também designada por *G. intestinalis* ou *G. lamblia*, é reconhecido como um parasita comum e um agente patogénico que infeta o homem em todo o mundo (19).

### 1.3.1 Taxonomia

O género *Giardia* pertence à ordem Diplomonadida e à família Hexamitidae (Figura 1) (27). Os membros da família Hexamitidae são facilmente reconhecidos por apresentarem dois núcleos posicionados lado a lado (28).

<b>Reino</b>	Protista
<b>Sub-reino</b>	Protozoa
<b>Filo</b>	Sarcomastigofora
<b>Sub-filo</b>	Mastigofora
<b>Classe</b>	Zoomastigofora
<b>Ordem</b>	Diplomonadida
<b>Família</b>	Hexamitidae
<b>Género</b>	<i>Giardia</i>
<b>Espécie</b>	<i>duodenalis</i>

**Figura 1.1** Taxonomia de *G. duodenalis* (adaptado de (27)).

*Giardia* é um parasita conhecido por infetar uma ampla gama de hospedeiros vertebrados. O género é atualmente composto por seis espécies, incluindo *Giardia agilis* em anfíbios, *Giardia ardeae* e *Giardia psittaci* em aves, *Giardia microti* e *Giardia muris* em roedores e *Giardia duodenalis* em mamíferos (Tabela 1). Estas espécies distinguem-se com base na sua morfologia e ultra-estrutura dos seus trofozoítos (29).

*G. duodenalis* é a única espécie encontrada no homem, embora outros mamíferos possam igualmente ser por ela parasitados, incluindo animais domésticos e peridomésticos. Muitos estudos têm contribuído com uma quantidade considerável de dados que demonstram que *G. duodenalis* apresenta variações a nível genético, tendo conduzido ao estabelecimento de oito genótipos distintos (A-H) com base em análises genéticas (30,31) (Tabela 1).

A análise de mais de um milhar de isolados obtidos de populações humanas a partir de diferentes localizações geográficas e examinados através da amplificação do DNA extraído diretamente das fezes pela técnica de PCR (*polymerase chain reaction*) demonstrou que em quase todos os casos, apenas os grupos genéticos A e B de *G.*

*duodenalis* estão associados a infecções no homem (31). Os restantes genótipos (C-H) foram isolados a partir duma grande variedade de animais (30,32,33) (Tabela 1). No entanto, o isolamento dos genótipos A e B tem sido efetuado em animais domésticos e selvagens (Tabela 1) (32), pelo que há a possibilidade de transmissão zoonótica ao homem (34,35).

**Tabela 1.1** Espécies de *Giardia* e genótipos de *G. duodenalis* (adaptado de (6)).

<b>Espécies</b>	<b>Principais hospedeiros</b>
<i>G. agilis</i> (Kunstler, 1882)	Anfíbios
<i>G. ardeae</i> (Noller, 1920)	Aves
<i>G. microti</i> (Benson, 1908)	Ratos-almiscarados e ratazanas
<i>G. muris</i> (Benson, 1908)	Roedores
<i>G. psittaci</i> (Erlandsen and Bemrick, 1987)	Aves
<i>G. varani</i> (Lavier, 1923a)	Lagartos
<i>G. duodenalis</i> (Davaine, 1875)	Mamíferos
Genótipo A	Homem, outros primatas, ruminantes domésticos e selvagens, alpacas, porcos, cavalos, canídeos domésticos e selvagens, furões, roedores, marsupiais e outros mamíferos
Genótipo B	Homem, outros primatas, gado, cães, cavalos, coelhos, castores e ratos-almiscarados
Genótipo C	Canídeos domésticos e selvagens
Genótipo D	Canídeos domésticos e selvagens
Genótipo E	Ruminantes domésticos e porcos
Genótipo F	Gatos
Genótipo G	Ratos e ratazanas
Genótipo H	Focas

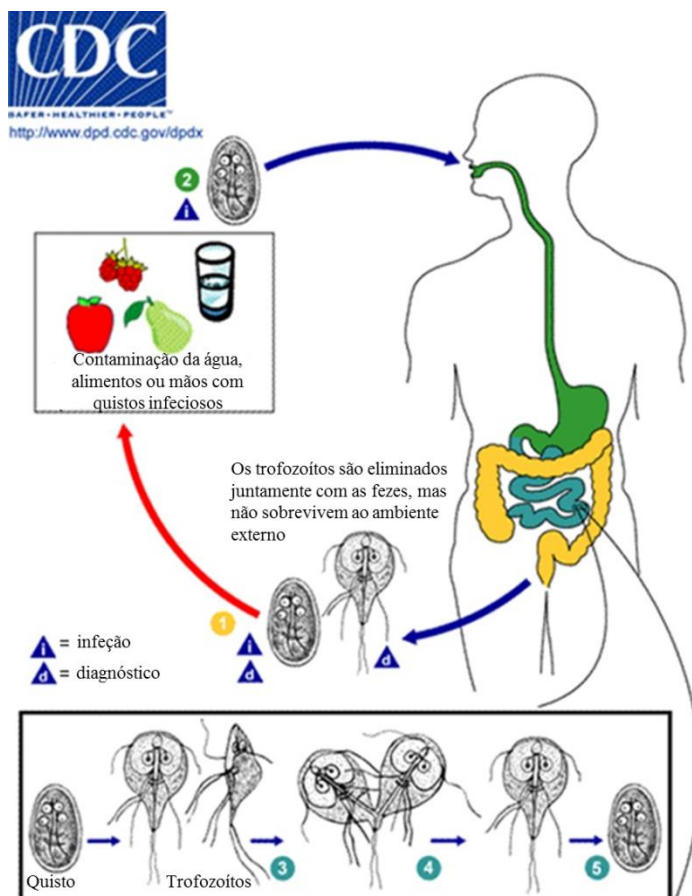
### 1.3.2 Agente etiológico e transmissão

*G. duodenalis* é um protozoário flagelado unicelular cujo ciclo de vida é simples e direto, envolvendo dois grandes estágios, o de trofozoíto e o de quisto. Os quistos são redondos ou ovais medindo 11-14 x 7-10 µm. Estes representam a forma infecciosa deste protozoário (36). A infecção por *G. duodenalis* ocorre pela ingestão de quistos viáveis,



que são transmitidos via fecal-oral por contaminação direta pessoa-a-pessoa, através de água e alimentos contaminados ou ainda pelo contato com fezes de animais com giardíase (6). A exposição ao ambiente ácido do estômago fornece os estímulos necessários para o processo de desenquistamento do trofozoíto no intestino delgado, mais especificamente no duodeno (37). O trofozoíto apresenta a forma de uma lágrima, arredondado na região anterior e afilado na região posterior, e mede cerca de 10-20 x 5-15  $\mu\text{m}$ . Na sua região ventral e côncava localiza-se uma estrutura, designada por disco ventral, que lhe permite aderir à superfície da mucosa intestinal (36). Os trofozoítos correspondem ao estágio replicativo, multiplicando-se por divisão binária até eventualmente voltarem a enquistar originando novos quistos. Estes são eliminados com as fezes do hospedeiro e são resistentes às condições ambientais externas. Este processo de enquistamento parece ocorrer em resposta à presença de sais biliares no intestino delgado. Os quistos são imediatamente infecciosos quando excretados nas fezes, podendo permanecer viáveis durante semanas a meses, no ambiente externo (Figura 1.2).

No homem, a dose infecciosa é de aproximadamente entre 10 a 100 quistos (Rendtorff 1954 citado por (38)) e a maioria das epidemias de giardíase tem sido associada ao consumo de água contaminada. Numa revisão recente foi relatado que dos 199 surtos publicados causados por protozoários durante o período de 2004-2010, 70 (35%) foram causados por *Giardia* (39).



**Figura 1.2** Ciclo de vida de *G. duodenalis* (adaptado de (40)).

### 1.3.3 Importância da giardíase na saúde pública

A giardíase é considerada como uma das infecções intestinais mais frequentemente diagnosticadas em todo o mundo (41,42). Para além disso, é também uma causa comum de doença diarreica no homem. Apesar de *G. duodenalis* causar doença em qualquer grupo etário, as crianças são o que apresenta maior risco de contrair giardíase clínica, especialmente aquelas que frequentam creches (43), que vivem em condições de higiene precárias (44) ou em ambientes comunitários (45), onde as infecções recorrentes contribuem para défices de crescimento e desnutrição (46).

*G. duodenalis* tem uma distribuição global, sendo estimados cerca de  $2,8 \times 10^8$  casos por ano (47). Na Ásia, África e América Latina, cerca de 200 milhões de pessoas sofrem de giardíase sintomática com cerca de 500.000 novos casos registados em cada ano (41). As taxas de prevalência no homem variam de 2-7% nos países de alto rendimento a 20-30% na maioria dos países de baixo e médio rendimento (29). Esta diferença deve-se sobretudo à falta de condições de higiene apropriadas e ao acesso

limitado ao fornecimento de água potável. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que mais de 1,7 milhões de pessoas morrem todos os anos com doenças associadas à falta de higiene, de infraestruturas sanitárias, de água limpa ou de tratamento de esgotos (WHO 2002 citado por (48)).

Em 2004 *G. duodenalis* foi incluída na “Iniciativa das Doenças Negligenciadas” pela OMS (26), não só pela elevada prevalência observada nos países de baixo e médio rendimento, mas também por aumentar de forma significativa a morbidade global, impedindo os indivíduos parasitados de atingirem todo o seu potencial em termos de desenvolvimento físico e socio-económico (26).

Atualmente, *G. duodenalis* é considerado um agente infeccioso re-emergente (48).

#### **1.3.4 Manifestações clínicas**

O espectro de sintomas da giardíase é muito variável, desde o portador assintomático a quadros de diarreia aguda ou crónica (49). Esta variabilidade pode estar associada a diversos fatores como a quantidade do inóculo, a duração da infeção e fatores específicos do hospedeiro e do próprio parasita (50).

O período de incubação da giardíase varia aproximadamente entre 12 a 20 dias (51). Nos casos de doença aguda, que dura 3 a 4 dias apenas, a giardíase não é muitas das vezes reconhecida como a causa. Esta é frequentemente confundida com outras doenças como enterite viral aguda, disenteria bacilar, envenenamento alimentar, amebíase intestinal aguda ou diarreia do viajante (por *Echerichia coli* enterotoxigénica) (50,51).

O início da doença pode ser acompanhado por náuseas, anorexia, indisposição, febre baixa e sensação de frio, podendo ocorrer o estabelecimento repentino de diarreia aquosa e fétida. Outros sintomas incluem dores epigástricas, flatulência e diarreia com quantidades crescentes de gordura e muco nas fezes, mas sem a presença de sangue. A perda de peso acompanha frequentemente estes sintomas (49,50), os quais também podem estar associados a anorexia e deficiências no crescimento (49).

Apesar da maioria dos indivíduos serem portadores assintomáticos, verificou-se que nos indivíduos sintomáticos com diarreia persistente cerca de 50% apresentavam evidências bioquímicas de malabsorção de gorduras, assim como de vitamina A e B12

(52).

### 1.3.5 Diagnóstico

O exame parasitológico é a técnica padrão utilizada no diagnóstico da giardíase, através da observação microscópica de quistos ou trofozoítos do parasita em amostras fecais (50,51). Os trofozoítos são normalmente detetados em fezes frescas diarreicas, mas também o podem ser em aspirados de fluido duodenal, seções histológicas obtidas por endoscopia ou por citologia endoscópica (52).

Considerando que os quistos são eliminados em intervalos irregulares, recomenda-se a análise de três amostras de fezes. A observação de uma única amostra de fezes permite a deteção de apenas 60 a 80% das infeções, de duas amostras de 80 a 90%, enquanto o exame de três amostras identifica mais de 90% (37). A observação microscópica pode ser realizada com o auxílio de colorações que evidenciam os quistos e os trofozoítos. A coloração de Lugol e a técnica do tricrómio são as mais comuns. As técnicas de centrifugação para concentração dos quistos também são recomendadas, uma vez que aumentam a probabilidade de deteção de *Giardia* nas amostras a analisar (50).

Ainda que a microscopia permaneça como técnica coprológica padrão, as técnicas imunocromatográficas e moleculares constituem métodos de diagnóstico complementar.

Os testes que têm por base a deteção de antigénios utilizam a técnica de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) ou de imunofluorescência para deteção de anticorpos contra trofozoítos ou quistos. As suas sensibilidades variam entre os 90 e 99%, com especificidades de 95 a 100% relativamente ao exame parasitológico padrão (Ledder et al 2002 citado por (53)). Apesar da eficácia destas técnicas, a microscopia pode detetar outros agentes causadores de doença diarreica, presentes na amostra. Para além disso, um dos principais problemas que advém deste tipo de testes é que nem todos têm a capacidade de distinguir entre infeções presentes e passadas (53).

A biologia molecular tem proporcionado novas e poderosas ferramentas para a caracterização de *Giardia*. A análise de diferenças genéticas anteriormente não reconhecidas dentro deste género revolucionou a compreensão da taxonomia, genética de populações e epidemiologia da giardíase no homem e em animais domésticos (54).

Adicionalmente, as técnicas moleculares têm-se revelado muito úteis nos casos em que ocorre eliminação de um número reduzido de quistos, que são dificilmente detetáveis através da microscopia, possibilitando a detecção de um único quisto de *Giardia* (55).

#### 1.3.5.1 Ferramentas de genotipagem

Em comparação com outros protozoários patogênicos, as técnicas de genotipagem para *Giardia* não estão particularmente avançadas (56). Os primeiros ensaios de PCR tiveram como alvo fragmentos de genes eucariotas bem conservados, chegando mesmo a utilizar primers degenerados para os genes do RNA ribossomal (18S *rRNA* e *ssurRNA*), glutamato desidrogenase (*gdh*), fator de alongamento 1-alfa (*efl-α*), triosefosfato isomerase (*tpi*) (32) ou genes associados exclusivamente com o parasita (*β-giardina*) (57,58). Em estudos mais recentes, um número de outros ensaios de PCR têm sido desenvolvidos e testados quanto à sua aplicabilidade para detecção e tipagem de *G. duodenalis*. Uma lista dos marcadores genéticos atualmente disponíveis encontra-se descrita na Tabela 2. Relativamente ao seu polimorfismo, estes genes são muito diferentes, com os genes *tpi* e *gdh* sendo os mais variáveis, seguidos pelos genes *bg* e *C4*, e por fim, os genes mais conservados *efl-α* e *ssurRNA* (32). O gene *ssurRNA* é o mais conservado e por isso é tradicionalmente usado para a diferenciação de espécies e de genótipos. Para além disso, devido à sua natureza multicópia, também se utiliza frequentemente para a detecção de *Giardia* a partir de diferentes fontes (isolados clínicos e ambientais) por apresentar uma elevada sensibilidade (38). O gene *tpi*, sendo mais variável, é maioritariamente o que se usa quando se quer efetuar subgenotipagem. Os genes *bg* e *gdh*, cuja taxa de conservação é intermédia entre os genes *ssurRNA* e *tpi*, têm um amplo espectro de aplicação, desde amostras humanas a animais, isolados clínicos ou ambientais (54).

Um aspeto que inicialmente recebeu pouca atenção foi o fato de que os *primers* desenvolvidos não amplificavam de forma consistentemente o DNA de *G. duodenalis*. É bastante fácil de explicar que o *ssurRNA* tenha maior sensibilidade, devido à sua natureza multicópia, e especificidade, devido à forte conservação das suas sequências. No entanto, uma desvantagem da utilização de genes conservados (com baixas taxas substituição) é a baixa resolução entre isolados relacionados, uma vez que permitem apenas a detecção de divergências mais antigas em detrimento de divergências recentes

(59). Por outro lado, a amplificação de genes de cópia única parece ser mais irregular. Tem sido relatado que certos isolados podem ser amplificados num *locus*, mas não noutra, ao passo que outros podem mostrar o comportamento oposto. A técnica de PCR não amplifica de forma consistente DNA parasitário em amostras confirmadas microscopicamente positivas para *G. duodenalis*, dependendo dos genes alvo (60–63). De acordo com alguns autores (31,54,64), dos vários genes utilizados na genotipagem de *G. duodenalis*, o *tpi* e o *gdh* parecem fornecer uma informação mais detalhada sobre os genótipos de *G. duodenalis*, uma vez que apresentam sequências mais polimórficas que permitem a clara distinção entre os mesmos. Contudo, a maior variabilidade apresentada parece conduzir a desequilíbrios excessivos nos locais de ligação dos *primers*, resultando numa baixa sensibilidade da reação de PCR (31).

**Tabela 1.2** Lista de *loci* genéticos utilizados para genotipagem, sua função e disponibilidade de informação a partir de diferentes espécies de *Giardia* ou de grupos genéticos de *G. duodenalis* (adaptado de (38)).

<b>Marcador genético</b>	<b>Função</b>	<b>Disponibilidade de sequências</b>	<b>Referência</b>
<b>Mlh1</b>	Envolvida na repação de DNA	Genótipos A e B de <i>G. duodenalis</i>	(65)
<b>Glutamato desidrogenase</b>	Enzima de manutenção	Genótipos de <i>G. duodenalis</i> , <i>Giardia muris</i> , <i>Giardia ardeae</i>	(32)
<b>Triose fosfato isomerase</b>	Enzima de manutenção	Genótipos de <i>G. duodenalis</i> , <i>Giardia microti</i> , <i>G. muris</i> , <i>G. ardeae</i>	(66)
<b>Beta-giardina</b>	Proteína estrutural	Genótipos de <i>G. duodenalis</i> , <i>G. muris</i>	(67)
<b>Factor de alongamento 1-<math>\alpha</math></b>	Envolvida no processo de tradução	Genótipos de <i>G. duodenalis</i> , <i>G. muris</i> , <i>G. ardeae</i>	(32)
<b>Ferredoxina</b>	Mediador da transferência de elétrons	Genótipos A e B de <i>G. duodenalis</i>	(65)
<b>Histona H2B</b>	Proteína nucleossomal	Genótipos A e B de <i>G. duodenalis</i>	(65)
<b>Histona H4</b>	Proteína nucleossomal	Genótipos A e B de <i>G. duodenalis</i>	(65)
<b>Actina</b>	Proteína estrutural	Genótipos A e B de <i>G. duodenalis</i> , <i>G. ardeae</i>	(68)
<b><math>\alpha</math>-tubulina</b>	Proteína estrutural	Genótipos A e B de <i>G. duodenalis</i>	(69)
<b>Chaperonina 60</b>	Proteína de choque térmico	Genótipos A e B de <i>G. duodenalis</i>	(70)
<b>Fase de leitura aberta C4</b>	Proteína hipotética de choque térmico	Genótipos A e B de <i>G. duodenalis</i>	(71)
<b>18S rRNA</b>	Pequena subunidade 18S do RNA ribossomal	Genótipos de <i>G. duodenalis</i> , <i>G. muris</i> , <i>G. microti</i> , <i>G. ardeae</i> , <i>Giardia agilis</i>	(32)
<b>ssurRNA</b>	Pequena subunidade do RNA ribossomal	Genótipos de <i>G. duodenalis</i>	(10)
<b>Espaçador intergênico ribossomal</b>	Ribossomal não codificante	Genótipos A e B de <i>G. duodenalis</i>	(72)
<b>ITS1, ITS2 e 5.8S rDNA</b>	Ribossomal	Genótipos de <i>G. duodenalis</i> , <i>G. muris</i> , <i>G. microti</i> , <i>G. ardeae</i>	(73)
<b>Proteína ribossomal L7a</b>	Ribossomal	Genótipos A e B de <i>G. duodenalis</i>	(65)

#### 1.3.5.1.1 Análise *multilocus*

Recentemente, a vasta maioria dos estudos de caracterização molecular de isolados de *G. duodenalis* obtidos de amostras humanas e de animais tem utilizado apenas um ou dois *loci* genéticos (31). Nos estudos iniciais, houve uma tendência no sentido da utilização do gene *ssurRNA* devido à sua natureza multicópia, elevado grau de conservação da sequência, maior facilidade de interpretação de infecções mistas dentro de um mesmo genótipo e redução da heterozigotia alélica das sequências (ASH) (59). Além disso, outros dados recentes demonstraram inconsistência nos resultados de genotipagem obtidos pelos diferentes *loci* genéticos para os mesmos isolados, tal como referido na secção anterior. Assim, a análise *multilocus* é cada vez mais utilizada para a caracterização genética de *G. duodenalis* (74).

Na análise *multilocus* conduzida por Cacciò e colaboradores (74) não se encontraram posições ambíguas nos cromatogramas de isolados de origem humana e animal para o genótipo A. Por outro lado, para o genótipo B, foram frequentemente encontradas sequências mistas para os genes *bg*, *gdh* e *tpi*. Apoiando este resultado, noutro estudo onde se analisaram as sequências de quatro genes (*ssurRNA*, *bg*, *gdh*, e *tpi*) de isolados de amostras humanas e animais verificou-se que os resultados de genotipagem se revelaram mais congruentes para os isolados pertencentes ao genótipo A. No caso dos isolados pertencentes ao genótipo B foi mais difícil, uma vez que o resultado obtido para um *locus* não era compatível com os resultados para os outros três *loci*. Adicionalmente, observaram-se diferentes níveis de variabilidade na heterogeneidade das sequências a nível dos subgenótipos dos isolados do genótipo B (74), o que impossibilitou a sua identificação inequívoca. O uso de *primers* específicos para a amplificação dos diferentes genótipos (75) mostrou claramente que uma percentagem elevada de infecções mistas não é detectada pelo PCR convencional, pelo que uma parte das sequências heterogéneas pode ser atribuída a infecções mistas. Mesmo assim, parece que o fenómeno de ASH nos isolados do genótipo B é maior do que para os isolados do genótipo A. A análise de quistos individuais, embora tecnicamente exigente, ajudaria a esclarecer a contribuição relativa das infecções mistas e por ASH no caso das sequências heterogéneas (74).

Para a obtenção de resultados mais consistentes, vários investigadores continuam a reforçar o uso de *primers* específicos para cada grupo genético, que permitam distinguir com maior precisão as infecções ao nível subgenotípico (76–78).



### **1.3.6 Tratamento**

Nos indivíduos imunocompetentes a giardíase pode ser eliminada naturalmente pelo seu sistema imunitário sem a necessidade de tratamento específico (52). A maior polêmica no tratamento da giardíase reside na questão que se relaciona com a administração ou não de terapêutica aos indivíduos assintomáticos, particularmente aqueles que residem em áreas endêmicas (52). Esta questão coloca-se especialmente no caso das crianças devido ao elevado risco de reinfeção após o tratamento. No entanto, se o crescimento e desenvolvimento da criança ficar comprometido o tratamento é aconselhado, apesar da possibilidade de reinfeção, pois poderá permitir atingir condições de crescimento e desenvolvimento normais (37). Por sua vez, crianças em condições nutricionais normais nos países de alto rendimento, ainda que sejam portadoras assintomáticas, poderão não necessitar de terapêutica. No entanto, os casos de diarreia atribuída à giardíase deverão ser considerados para tratamento (37). A principal discussão do tratamento dos portadores assintomáticos reside nas consequências da transmissão da infecção. Por este motivo, é recomendado que indivíduos que manipulem alimentos sejam tratados, de forma a prevenir epidemias de origem alimentar (37). De acordo com Gardner e Hill (37) os nitroimidazóis, quinacrina, furazolidona, benzimidazóis, paramomicina e bacitracina de zinco constituem as principais classes de agentes terapêuticos (Tabela 3).

**Tabela 1.3** Doses de fármacos recomendadas para o tratamento da giardíase em adultos e crianças e respetiva eficácia (adaptado de (37)).

<b>Fármaco</b>	<b>Dose adulta</b>	<b>Dose pediátrica</b>	<b>Eficácia (%)</b>
<b>Metronidazol</b>	250 mg 3/dia (5-7 dias)	5 mg/kg 3/dia (5-7 dias)	93-100
<b>Tinidazol</b>	2 g dose única	50 mg/kg dose única (máximo 2 g)	86-100
<b>Ornidazol</b>	2 g dose única	40-50 mg/kg dose única (máximo 2 g)	96-100
<b>Quinacrina</b>	100 mg 3/dia (5-7) dias	2 mg/kg 3/dia (7 dias)	95-100
<b>Furazolidona</b>	100 mg 3/dia (7-10 dias)	2 mg/kg 3/dia (10 dias)	80-85
<b>Albendazol</b>	400 mg 1/dia (5 dias)	15 mg/kg/dia (5-7 dias) (máximo 400 g)	94-100
<b>Paromomicina</b>	500 mg 3/dia (5-10 dias)	30 mg/kg/dia em 3 doses (5-10 dias)	55-88
<b>Bacitracina de zinco</b>	120 000 U 2/dia (10 dias)	Não testado em crianças com idades inferiores a 10 anos	95

### 1.3.7 Epidemiologia molecular

Vários estudos indicam que nas Américas parece haver áreas com diferentes predominâncias de genótipos. Estudos feitos no México, Brasil e Colômbia identificaram elevadas frequências do genótipo A, enquanto os estudos de Nicarágua e Argentina mostram que o genótipo B é o predominante nestes países (79–81). No Sul e Sudeste asiático, incluindo Índia, o genótipo A parece predominar, assim como na Europa (82–84). O número de estudos epidemiológicos moleculares da giardíase no homem é ainda reduzido e não permite uma identificação da existência de diferenças geográficas ou socioeconómicas na distribuição dos genótipos A e B, nem uma avaliação do papel das infeções antroponóticas e zoonóticas da giardíase no homem (6) (Figura 1.3). Apesar dos dados atualmente disponíveis não nos permitirem tirar nenhuma conclusão (31), a análise molecular de mais de 2800 amostras indicou que o genótipo B (58%) tem uma prevalência maior do que o A (37%) a nível mundial (85).

Esta proporção parece ser independente do desenvolvimento socioeconómico do país (38). A Figura 1.3 ilustra a distribuição mundial dos genótipos de *G. duodenalis*, como resultado duma revisão baseada em 50 estudos (12).

Em relação às variações geográficas na distribuição dos genótipos de *G. duodenalis* alguns autores propõem que essa variação poderá estar relacionada com as diferentes vias de transmissão e diferentes fontes infecção (6).



**Figura 1.3** Distribuição geográfica dos genótipos A e B de *G. duodenalis* (adaptado de (12)).

### 1.3.8 Genótipos de *G. duodenalis* e quadro clínico da doença

As manifestações clínicas da giardíase são bastante variáveis, desde a ausência de sintomas (relatada entre 60 a 80% dos casos) (36,86) a casos de diarreia aguda ou crónica, desidratação, dor abdominal, náuseas, vômitos e perda de peso (87).

A gravidade da doença é determinada pela interação entre a virulência do parasita, o estado nutricional e imunológico do hospedeiro, a natureza da microflora intestinal e a presença ou ausência de outros agentes intestinais patogénicos (6). Inclusivamente foi descrito que a giardíase sintomática está principalmente limitada a jovens e idosos (9,88), acreditando-se que a suscetibilidade destes grupos etários se deve à imaturidade do sistema imunológico e à incompetência imune, respetivamente (89).

Embora os diferentes genótipos de *G. duodenalis* possam produzir eventualmente diferentes toxinas ou produtos metabólicos que contribuam para a sua

patogenicidade (88) ou diferenças a nível da variação antigénica e especificidade do hospedeiro (46,56,90), os estudos sobre a possível associação entre os grupos genéticos de *G. duodenalis* e a sua virulência (indicado pela probabilidade de causar diarreia e outros sintomas clínicos) continuam a apresentar resultados inconsistentes (6).

#### **1.3.8.1 Diarreia e outros sintomas clínicos**

A OMS define diarreia como a passagem de fezes invulgarmente moles ou aquosas, pelo menos três vezes num período de 24 horas (91).

Apesar de vários estudos terem demonstrado uma correlação entre as infeções por *G. duodenalis* pertencente ao genótipo B com sintomatologia mais grave, outros têm correlacionado os sintomas mais graves com infeções pelo genótipo A (90) (Tabela 1.4).

**Tabela 1.4** Associação entre os genótipos de *G. duodenalis* a gravidade da diarreia e outros sintomas (adaptado de (12)).

País	Idade	Gene usado (genotipagem)	Conclusão	Referências
Arábia Saudita	Crianças	<i>IGSrDNA</i>	Genótipo B – sempre sintomático	(92)
Austrália	< 5 anos	<i>ssurRNA</i>	Genótipo A – 26 vezes mais provável nos casos de diarreia	(11)
Bangladesh	Todas	<i>tpi</i>	Genótipo A – maior probabilidade de diarreia (OR: 2,11)	(93)
Cuba	Crianças	$\beta$ -giardina, <i>gdh</i>	Genótipo B – associado a sintomas	(94)
Egipto	Todas	<i>tpi</i>	Genótipo A – diarreia intermitente, sintomas mais graves	(95)
Espanha	< 5 anos	<i>tpi</i>	Genótipo AII – associado aos sintomas	(9)
Etiópia	Todas	$\beta$ -giardina, <i>tpi</i> , <i>gdh</i> e <i>ssurRNA</i>	Genótipo B – correlação mais forte com episódios de diarreia	(96)
Índia	< 3 anos	<i>tpi</i>	Genótipo A – associado à diarreia	(83)
Inglaterra	Todas	<i>tpi</i> e <i>ssurRNA</i>	Genótipo A – febre mais frequente	(97)
Irão	Todas	<i>tpi</i>	Genótipo A – associado à diarreia	(98)
Holanda	Todas	<i>gdh</i>	Genótipo B – doença mais grave	(99)
Malásia	Todas	<i>ssurRNA</i>	Genótipo B – maior risco de sintomas	(8)
Peru	< 9 anos	<i>gdh</i>	Genótipo A – associado à diarreia	(100)
Tailândia	Todas	$\beta$ -giardina, <i>tpi</i> , <i>gdh</i> e <i>ssurRNA</i>	Genótipo BIII – associado aos sintomas	(88)
Turquia	Todas	<i>tpi</i>	Genótipo A – associado aos sintomas	(101)

Um fator não considerado em estudos anteriores foi a variação genética dentro do próprio genótipo, o que poderia explicar as diferenças observadas entre estes (102). Uma das sugestões colocadas foi que, em regiões onde um determinado genótipo é endêmico, o aparecimento de um novo genótipo pode causar sintomas particularmente graves quando aparece pela primeira vez na população, e a infecção mista pelos dois grupos poderá provocar um aumento sinérgico na gravidade da patologia (90).

De considerar ainda que os diferentes marcadores genéticos usados em cada estudo podem também ter influenciado no resultado observado. Como tal, Almeida *et al* (78) referem que quase todos os estudos a nível mundial baseados na genotipagem dos genes *ssurRNA* e *tpi* apoiam a associação entre o genótipo A com a doença sintomática, enquanto os estudos baseados nos genes *bg* e *gdh* apoiam a associação entre o genótipo B com a doença sintomática.

#### **1.3.8.2 Malnutrição**

A malnutrição constitui um grave problema de saúde pública e um dos maiores desafios a combater na atualidade, nomeadamente nos países de baixo e médio rendimento (103). As crianças representam um dos grupos mais afetados pela malnutrição, uma vez que apresentam elevadas exigências nutricionais para o seu crescimento e desenvolvimento (2,104). A malnutrição é responsável por cerca de metade das mortes (45%, aproximadamente 3,1 milhões) em crianças com idades inferiores a cinco anos (105). Aqueles que sobrevivem a um estado de malnutrição sofrem de sequelas a longo-prazo incluindo dificuldades no crescimento e atrasos no desenvolvimento neurológico (106). Apesar da pobreza, associada à escassez de alimentos, ser considerada como um dos principais riscos para a malnutrição, a etiologia desta condição é bastante mais complexa. A malnutrição infantil persistente é considerada como parte integrante de um ciclo vicioso de infeções recorrentes, enfraquecimento imunitário, agravamento da malnutrição e de fatores genéticos (107).

Os indicadores da malnutrição incluem a desnutrição crónica, a desnutrição aguda e o baixo peso, que representam diferentes aspectos da malnutrição (108). A desnutrição aguda corresponde ao baixo peso para o comprimento/estatura e representa uma perda de peso recente, para além de ser indicadora das deficiências nutricionais

presentes (Figura 1.4). A desnutrição crónica ou o baixo comprimento/estatura para a idade é um indicador da redução da taxa de crescimento linear (Figura 1.4). O baixo peso, que é medido em relação à idade, constitui uma combinação da desnutrição aguda e crónica (Figura 1.4) (109).

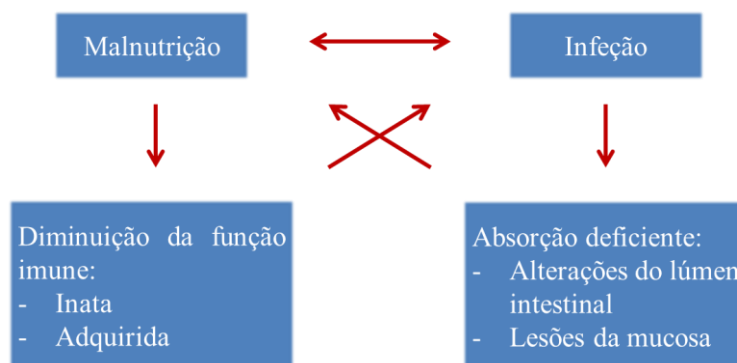


**Figura 1.4** Tipos de desnutrição (adaptado de (110)).

A antropometria é o método mais utilizado para avaliar as dimensões, proporções e composição do corpo humano. É um método universal, não dispendioso, prático e não invasivo, cujos parâmetros antropométricos comumente usados incluem o peso, comprimento/estatura (comprimento para crianças até aos dois anos de idade e estatura para crianças com idade superior), perímetro cefálico e perímetro braquial (111). Estas medidas por si só não são informativas o suficiente, a não ser quando convertidas em índices antropométricos, que são expressos em percentis, percentagem do valor da mediana e em *Z-scores* (112,113). Os valores de *Z-scores* correspondem ao número de desvios-padrão acima ou abaixo do valor padrão médio de crescimento indicado pela OMS (114). Nas crianças, os índices antropométricos mais utilizados são três: o peso para o comprimento/estatura (PEZ), o comprimento/estatura para a idade (EIZ) e o peso para a idade (PIZ). Estes permitem-nos determinar a desnutrição aguda, a desnutrição crónica e o baixo peso, respetivamente. Para além disso, cada um destes índices antropométricos pode ser classificado quanto ao grau de desnutrição. Assim, considera-se desnutrição grave quando o valor de *Z-score* é inferior a -3, moderada quando se situa entre -2 e -3 e ligeira entre -1 e -2 (114–116).

Estima-se, que a nível mundial, cerca de 52 milhões de crianças com menos de cinco anos de idade sofra de desnutrição aguda (117) e 165 milhões de desnutrição

crónica (118). Como referido anteriormente, a malnutrição e infeção constituem um ciclo vicioso, onde a malnutrição torna o indivíduo mais suscetível à infeção, assim como esta contribui para um estado de malnutrição (2) (Figura 1.5).



**Figura 1.5** Interação entre a malnutrição e infeção (adaptado de (2)).

O efeito prejudicial da giardíase no crescimento e desenvolvimento infantil tem sido observado em vários estudos (6) e os potenciais efeitos da desnutrição crónica na cognição, inteligência e desenvolvimento psicomotor também têm sido descritos (119,120). Pensa-se que a malnutrição associada à infeção por *G. duodenalis* se deva à malabsorção causada pela diarreia crónica típica da giardíase (6).

A maioria dos estudos que relaciona a giardíase com o estado nutricional do hospedeiro foi realizada em populações infantis, uma vez que estas são as mais afetadas por esta patologia. Vários estudos determinaram que a malnutrição em crianças é uma consequência da infeção por *Giardia* (5,121–126). No entanto, apenas um estudo publicado em 2012 relaciona a associação do genótipo de *G. duodenalis* com o estado nutricional infantil (121). Neste trabalho, os investigadores sugerem que existe uma associação entre o genótipo B e a desnutrição por baixo peso em crianças com menos de cinco anos de idade.

### 1.3.8.3 Infeção pelo VIH

A infeção por VIH modificou não só a epidemiologia das infeções parasitárias, como também os seus efeitos e consequências (127).

Estudos indicam que 30 a 60% dos doentes com SIDA apresentam diarreia, e nos países de baixo e médio rendimento esse número pode atingir os 90% (128). A



incidência de infecções por parasitas intestinais afeta 95% dos indivíduos portadores de VIH nesses mesmos países. Estas infecções intestinais podem ser causadas tanto por protozoários como por helmintas e a sua principal manifestação clínica é a diarreia (129).

A maioria dos estudos que explora a relação entre a infecção por protozoários intestinais e a infecção pelo VIH está sobretudo descrita para *Cryptosporidium* sp. (130). Apesar de alguns resultados demonstrarem que a prevalência da infecção por *G. duodenalis* em indivíduos portadores de VIH e sem VIH é muito semelhante (128,131,132), outros demonstraram a existência de diferenças estatisticamente significativas (133,134). Alguns autores pesquisaram a relação entre a infecção por *G. duodenalis* e a contagem de células T CD4<sup>+</sup> em indivíduos infetados pelo VIH, não encontrando evidências estatisticamente significativas que justifiquem essa relação (135,136). Independentemente dos resultados obtidos nos estudos mencionados os indivíduos com VIH parecem não apresentar um risco aumentado de desenvolver giardíase sintomática (52). Isto poderá dever-se ao facto da imunidade secretória no lúmen intestinal ser mais importante para a eliminação da infecção por *G. duodenalis* do que as respostas imunitárias mediadas por células na mucosa intestinal (52).

Relativamente à possível associação entre determinado genótipo de *G. duodenalis* e a infecção pelo VIH em crianças os estudos são ainda mais raros, porque na sua maioria focam-se em *Cryptosporidium* sp. Na realidade, existem apenas dois estudos publicados nos quais os autores tentaram estabelecer uma relação entre as manifestações clínicas da giardíase em indivíduos com VIH com os respetivos genótipos do parasita (137,138). Contudo, tal não foi possível devido ao número reduzido de amostras positivas analisadas num dos estudos (138) e à inexistência de infecção por *G. duodenalis* nos indivíduos com VIH no outro estudo (137). Investigações com um maior número de amostras poderiam ajudar a esclarecer este assunto, cuja pertinência se deve sobretudo ao facto de *G. duodenalis* ser resistente aos tratamentos convencionais da água de consumo e os conhecimentos adquiridos com os estudos epidemiológicos moleculares poderão promover os esforços da prevenção clínica da doença em indivíduos infetados pelo VIH (138).

#### **1.4 Relevância e objetivos do estudo**

Tendo em conta o reduzido número de estudos de carácter hospitalar em zonas endémicas, a investigação da associação entre a infeção por *G. duodenalis* com o estado nutricional, diarreia e infeção pelo VIH em crianças dos 0 aos 59 meses, no Hospital Central de Nampula (HCN) contribuirá para a melhor compreensão destes ciclos de infeção-malnutrição no contexto hospitalar. Adicionalmente, a caracterização molecular de *G. duodenalis* poderá esclarecer a existência de uma relação entre os seus genótipos e a gravidade da doença, o estado nutricional e infeção pelo VIH em crianças menores de cinco anos. Para responder às questões anteriores, este trabalho teve como objetivos específicos:

- 1) a caracterização sociodemográfica da população em estudo;
- 2) a determinação da frequência de todas as parasitoses intestinais nas crianças das Enfermarias de Malnutrição e Diarreias (EM e ED), das Consultas Externas de VIH e Malnutrição (CH e CM) do HCN e da respetiva variação sazonal (época das chuvas Vs época seca);
- 3) a caracterização molecular de *G. duodenalis*;
- 4) a determinação da frequência de crianças com diarreia e com sintomas gastrointestinais, de crianças desnutridas por baixo peso, desnutrição crónica e aguda e da frequência de crianças infetadas pelo VIH.

## ***2 Material e Métodos***

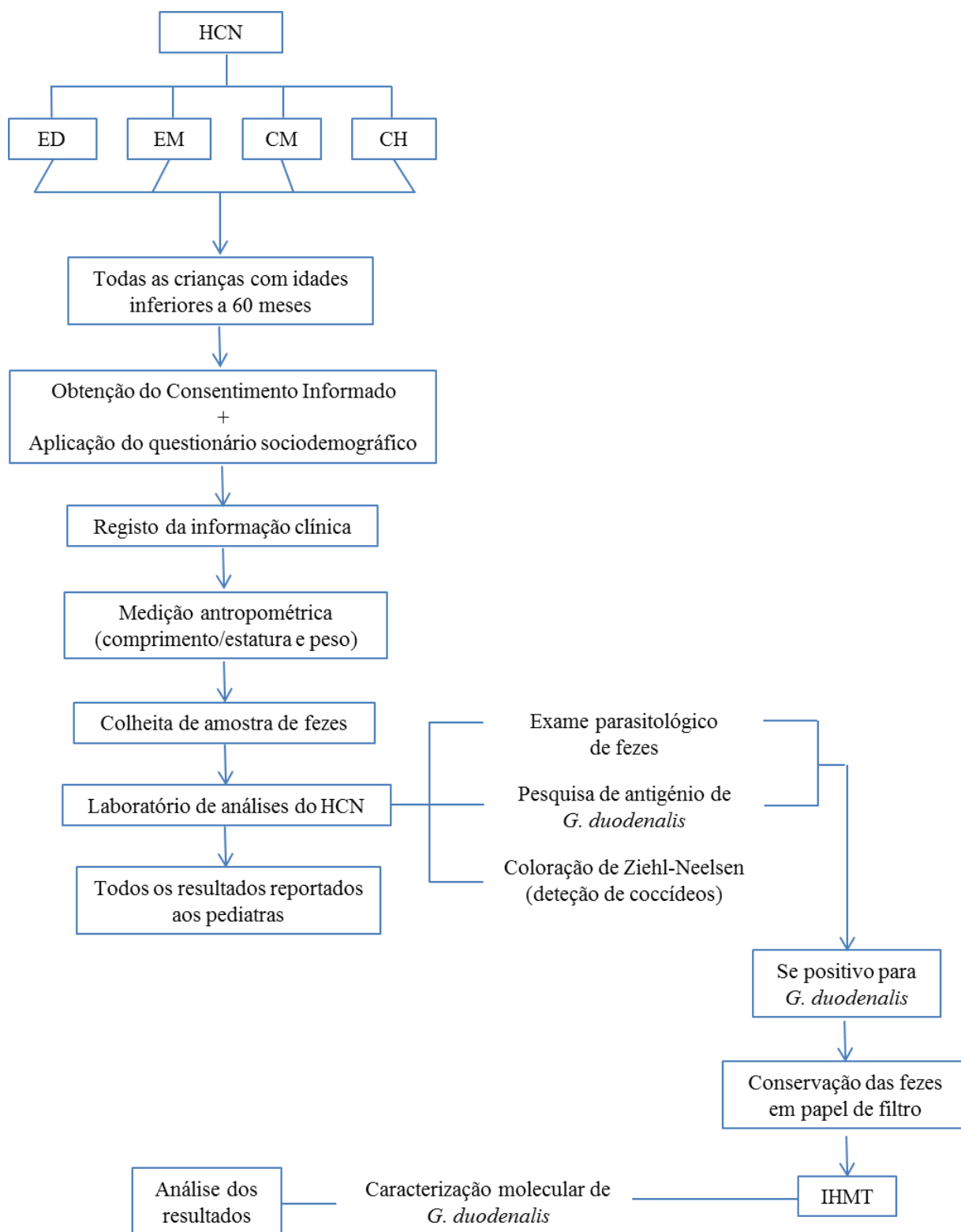


## **2.1 Desenho do estudo**

Para a elaboração deste trabalho realizou-se um estudo observacional analítico transversal, no qual participaram 831 crianças, dos 0 aos 59 meses de idade, recrutadas na Enfermaria das Diarreias (335) (ED), Enfermaria da Malnutrição (274) (EM), Consulta Externa de Malnutrição (104) (CM) e Consulta Externa de VIH (118) (CH) do Hospital Central de Nampula (HCN). Uma amostra de fezes foi obtida por cada criança participante.

O método de amostragem foi não-probabilístico, com uma amostragem por conveniência, não só pela maior facilidade operacional, como também devido à impossibilidade de acesso a uma listagem completa de todas as crianças frequentadoras das enfermarias e consultas externas do HCN. Assim sendo, foram recrutadas todas as crianças que se encontravam nas enfermarias ou consultas externas, no momento em que o investigador principal se dirigia a estes locais, que cumpriam os critérios de inclusão no estudo (idades inferiores ou iguais a 59 meses e obtenção do consentimento informado por parte do cuidador – Anexo I) e que ainda não tinham sido recrutadas.

O período de colheita de amostras correspondeu à época das chuvas e seca de 2012 (Fevereiro-Abril e Junho-Setembro) e 2013 (Janeiro-Março e Junho-Agosto). Os dados sociodemográficos e clínicos foram igualmente obtidos, assim como o registo dos dados antropométricos. A Figura 2.1 representa o fluxograma do estudo.



**Figura 2.1** Fluxograma do estudo.

## 2.2 Caracterização da área em estudo

Moçambique localiza-se no Sudeste Africano, faz fronteira com outros seis países, (República da Tanzânia, Malawi, Zâmbia, Zimbabwe, República da África do Sul e Suazilândia) e tem mais de 2500 km de linha de costa banhada pelo Oceano Índico (139).

Este país está organizado em 11 Províncias (Niassa, Cabo Delgado, Nampula, Zambézia, Tete, Manica, Sofala, Inhambane, Gaza, Maputo Província e Maputo Cidade) e 128 Distritos (140). Em 2007, a população total do país era de 20 366 795 habitantes, com uma esperança média de vida de 48 anos. A mortalidade infantil abaixo dos cinco anos de idade situava-se em 142 crianças em 1000 (141). Cerca de 60% dos habitantes vivia em áreas rurais, onde o principal meio de subsistência é a agricultura (141).

A província de Nampula, onde foi realizado este estudo é constituída por 18 distritos como se pode observar pelo mapa ilustrado na Figura 2.2.



**Figura 2.2** Localização geográfica da província de Nampula em Moçambique e mapa da província de Nampula com os respectivos distritos (142).

O distrito de Nampula possui uma superfície de 3739km<sup>2</sup> e uma população estimada em 2005 de 153449 habitantes. Apresenta uma população jovem de 44%, (abaixo dos 15 anos de idade), um índice de masculinidade de 50% e uma matriz rural acentuada (16).

### **2.3 Determinação do tamanho da amostra**

Para o cálculo do tamanho da amostra considerou-se uma prevalência de parasitoses intestinais desconhecida na população a estudar. Adicionalmente, como um dos objetivos deste estudo incluía a determinação da variação sazonal das frequências dessas parasitoses, considerou-se uma variação na frequência de parasitoses de 10% entre as duas épocas, com uma frequência de 50% para a época das chuvas e de 40% para a seca. Deste modo, o tamanho da amostra foi estimado utilizando-se o *software Epitools* com um intervalo de confiança de 95% e uma potência de teste de 80%. De acordo com o *software* utilizado o tamanho da amostra seria de 408 crianças por época, colhidas em dois anos consecutivos (204 crianças por época por ano), num total de 816 crianças. O facto da colheita das amostras ter sido realizada em dois anos consecutivos prendeu-se com a dificuldade da obtenção de uma amostra de 408 crianças numa única época, devido a questões logísticas e de recursos humanos. O investigador principal incluiu no estudo todas as crianças novas, no internamento ou nas consultas externas, no momento em que se dirigia a um destes locais para recrutar ou recolher amostras de fezes das crianças já recrutadas no dia anterior.

### **2.4 Questionários sociodemográficos e clínico**

Os dados sociodemográficos e clínicos (sintomatologia) foram adquiridos através de um questionário aplicado aos representantes legais das crianças incluídas no estudo (Anexo II e IV, respetivamente). Este questionário foi elaborado com base num questionário usado num projeto sobre a avaliação de eficácia das campanhas de desparasitação em crianças em idade pré-escolar de São Tomé e Príncipe e foi testado previamente em 10 utentes do HCN. O questionário sobre a sintomatologia foi completado com a informação médica dos respetivos processos clínicos.



## **2.5 Determinação do estado nutricional**

O peso e comprimento/estatura de cada criança foi registado aquando da colheita de fezes (Anexo III). O peso foi obtido a partir das balanças de prato disponíveis no HCN, com uma precisão de 100 gramas para todas as crianças, excetuando as crianças da Enfermaria das Diarreias que foram pesadas com uma balança digital com a precisão de 100 gramas. Todas as crianças com menos de 24 meses, que frequentavam as Consultas Externas (Malnutrição e VIH), foram medidas deitadas com um estadiómetro de madeira (precisão de 0,1 de centímetros) e as crianças da Enfermaria das Diarreias e da Malnutrição com um estadiómetro tipo esteira (precisão de 0,5 centímetros), com ajuda do cuidador para o posicionamento correto da cabeça para todos os casos. Nas crianças com idade igual ou superior a 24 meses as medidas foram obtidas em pé com um estadiómetro de parede (precisão de 0,1 centímetros), com exceção daquelas que se encontravam demasiado debilitadas para permanecerem em pé. Estas medições foram realizadas em duplicado para cada criança e foram registadas por apenas um observador (investigador principal).

Os *Z-scores* do peso e do comprimento/estatura foram calculados através do *software WHO Anthro* (v 3.0.1, WHO, Geneva, Switzerland) da OMS e confirmados com o programa *ENA for Smart (Emergency Nutrition Assessment, 2007)*. O PEZ, EIZ e PIZ foram utilizados como indicadores nutricionais de acordo com os padrões de crescimento infantil definidos pela OMS, tal como descrito na seção 1.3.8.2. Cada um dos tipos de desnutrição foi classificado em diferentes graus (ligeiro, moderado e grave), de acordo com os valores de *Z-score* obtidos.

## **2.6 Diagnóstico parasitológico**

Este procedimento foi realizado no Laboratório do HCN e todos os resultados foram comunicados aos médicos pediatras responsáveis e registados nos processos clínicos de cada criança.

### **2.6.1 Exame microscópico**

As amostras de fezes foram colhidas para contentores específicos e estéreis fornecidos aos pais ou cuidadores, após explicação prévia do procedimento de colheita. Esta realizou-se sem a necessidade de indução ou de qualquer outro estímulo externo.

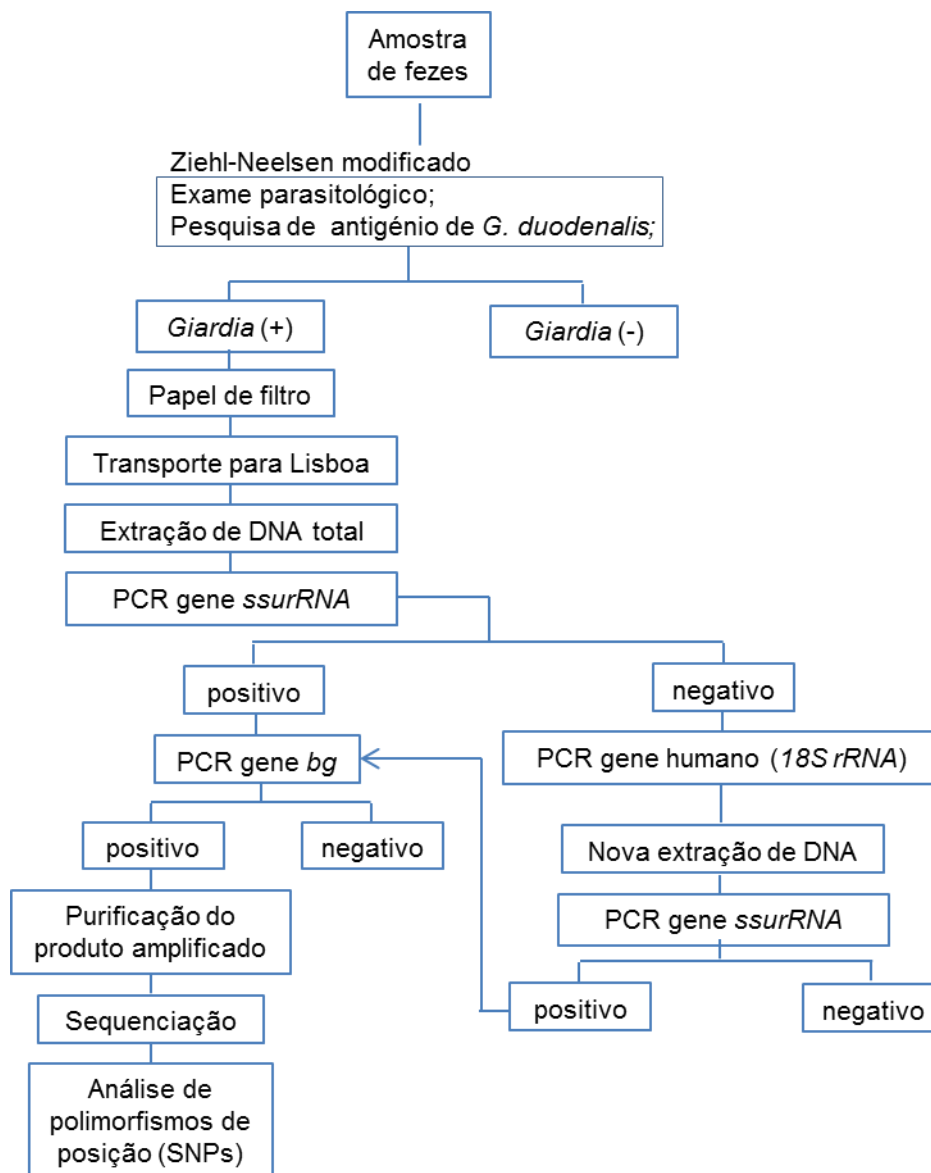
As fezes frescas foram processadas de acordo com as técnicas coprológicas padrão (exame directo e método de Ritchie de concentração) para a observação microscópica, com recurso à coloração de Lugol. Foi ainda realizada a observação microscópica das fezes frescas directamente na lâmina. A coloração de *Ziehl-Neelsen* modificada foi utilizada para a detecção de *Cryptosporidium* sp. e de outros coccídeos, como *Cystoisospora belli* e *Cyclospora cayetanensis*.

### **2.6.2 Detecção de antígeno de *G. duodenalis***

Todas as amostras de fezes colhidas foram analisadas por testes imunocromatográficos, também designados por testes de detecção rápida (TDR), para a detecção de antígeno de *G. duodenalis* (RIDA®QUICK Giardia, R-Biopharm e CERTEST Giardia da Biotec), de acordo com as instruções dos respetivos fabricantes.

### **2.7 Análise molecular de *G. duodenalis***

Todas as amostras nas quais se identificou *G. duodenalis*, quer através do exame microscópico quer através dos testes imunocromatográficos, foram conservadas em papel de filtro FTA (Qiagen) através do decalque das mesmas, as quais foram mantidas a -20°C até ao seu transporte para o Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT) em Lisboa, Portugal. Na Figura 2.3 encontra-se esquematizado o processamento das amostras com identificação positiva para *G. duodenalis*, desde a sua obtenção no HCN até à análise molecular final.



**Figura 2.3** Fluxograma do processamento das amostras com identificação positiva para *G. duodenalis*.

### 2.7.1 Extração de DNA

As amostras conservadas em papel de filtro foram sujeitas a um protocolo de extração de DNA, através do *kit* comercial *QIAamp DNA Micro Kit* (Qiagen). Como o protocolo original foi concebido para a extração de DNA a partir de amostras de sangue conservadas em papel de filtro, procederam-se a algumas alterações ao protocolo original de modo a otimizar-se a extracção de DNA a partir do material fecal. Para tal,

utilizaram-se três *spots* iniciais e aplicou-se um volume final de eluição de 25 µl. Todos os restantes passos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante.

Em cada extração realizada incluiu-se um controlo negativo da extração, que consistia em *spots* de papel de filtro sem amostra fecal.

### **2.7.2 Amplificação de fragmentos de DNA de *G. duodenalis* por PCR**

Para a deteção e identificação molecular de *G. duodenalis* por PCR utilizou-se o *kit* comercial *illustra™ PuReTaq™ Ready-To-Go™ PCR Beads* (GE HealthCare Life Sciences).

Em todas as reações de amplificação incluiu-se DNA de *G. duodenalis* da estirpe de referência Portland-1 como controlo positivo (ATCC 30888DTM LGC Promochem) e um controlo negativo da reação (*no template*). Os controlos negativos da extração de DNA foram igualmente testados.

Os produtos amplificados foram visualizados em luz ultravioleta (UV), após electroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio.

#### **2.7.2.1 Gene *ssurRNA***

Todas as amostras extraídas foram amplificadas para uma região do gene *ssurRNA* através de uma técnica de *nested* PCR. Na primeira reação utilizaram-se os *primers* RH11 e RH4 (10) e na segunda reação os *primers* GiarF e GiarR (11). Esta reação permite a amplificação de um produto de PCR de 175 pares de bases (pb). As condições de amplificação foram as descritas por Hopkins *et al* (10) com as modificações indicadas na Tabela 2.1.

As amostras sem amplificação de DNA de *G. duodenalis* foram sujeitas a nova extração de DNA e posterior amplificação.

#### **2.7.2.2 Gene *β-giardina* (*bg*)**

As amostras amplificadas com sucesso para o gene *ssurRNA* foram testadas para o gene *bg*. A amplificação deste gene também foi realizada através de uma técnica de *nested* PCR. Na primeira reação utilizaram-se os *primers* G7 e G759 (67) e na segunda os *primers* G8 e G9 (57). Esta reação permite a amplificação de um produto de PCR de

511 pb. As suas condições de amplificação foram as descritas por Lalle *et al* (57) com as modificações indicadas na tabela 2.1.

**Tabela 2.1** Condições de amplificação utilizadas para os genes *ssurRNA* e *bg*.

Gene alvo	Primers	Concentração dos primers	Volume de DNA	Volume final	Condições de amplificação
<i>ssurRNA</i>	RH11/RH4	12,5 pmol	2 µl	25 µl	96°C 5', (35 ciclos) 96°C 30'', 55°C 30'' e 72°C 45'', 72°C 7'
	GiarF/GiarR	12,5 pmol	2 µl	25 µl	
<i>bg</i>	G7/G759	10 pmol	2 µl	25 µl	95°C 15', (35 ciclos) 95°C 30'', 60°C <sup>a</sup> 30'' e 72°C 1', 72°C 7'
	G8/G9	10 pmol	2 µl	25 µl	95°C 15', (35 ciclos) 95°C 30'', 55°C 30'' e 72°C 1', 72°C 7'

### 2.7.2.3 Gene da subunidade 18 do RNA ribossomal (*18S rRNA*) humano

Nos casos em que não se verificou amplificação de DNA parasitário para o fragmento do gene *ssurRNA*, procedeu-se à amplificação do gene *18S rRNA* humano usado como controlo interno de amplificação. Este procedimento assegurou que a extração de DNA tinha sido bem sucedida e que a ausência de amplificação de DNA parasitário não correspondia a um falso negativo. Estas amostras foram posteriormente sujeitas a nova extracção de DNA.

### 2.7.3 Purificação e sequenciação de DNA

Os produtos amplificados do fragmento do gene *bg* foram purificados para posterior sequenciação utilizando o *kit* de purificação *illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE HealthCare Life Sciences), de acordo com as instruções do fabricante.

Os produtos de PCR foram sequenciados em ambas as direções com os *primers* G8 e G9 pela empresa STAB VIDA.

#### 2.7.4 Análise de polimorfismo de posição (SNPs)

As sequências obtidas foram comparadas com a base de dados GenBank<sup>TM</sup> ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)) através do *software* BLAST. Procedeu-se igualmente ao alinhamento das sequências obtidas com sequências de referências para *G. duodenalis* publicadas no GenBank<sup>TM</sup> através do programa Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). O programa BioEdit versão 7.0.9 (Ibis Biosciences) permitiu a identificação dos polimorfismos de posição para cada sequência, de acordo com as posições descritas por Cacciò *et al* (74).

### 2.8 Tratamento dos dados e análise estatística

Os dados obtidos foram analisados através do programa *Statistical Package for Social Sciences* – SPSS v20 e Excel 2010.

Na caracterização das variáveis em estudo foram utilizadas contagens (frequências absolutas, *n*) e percentagens (frequências relativas, %). Foram calculados os respectivos intervalos de confiança a 95% (IC 95%) para as percentagens.

Para avaliar as variáveis independentes possivelmente associadas às variáveis dependentes realizou-se um procedimento de regressão logística binária (Tabela 2.2). Com esta análise obtiveram-se os valores de *p*, assim como os valores de Odds Ratio (OR) e os seus respetivos intervalos de confiança a 95%, considerados brutos (não ajustados). Nos casos onde não foi possível obter o valor de *p* através deste tipo de análise, recorreu-se ao teste Qui-Quadrado de Pearson ou teste Exacto de Fisher.

Posteriormente realizou-se uma análise de regressão logística multivariada, para as variáveis dependentes, cujo valor de *p* fosse inferior a 20%. As estimativas de OR e os seus respectivos IC 95% para as categorias de cada variável independente, obtidos através da análise multivariada, correspondem aos valores após o ajustamento. O ajustamento dos modelos foi avaliado pelo teste de Hosmer and Lemeshow.

**Tabela 2.2** Variáveis dependentes e variáveis independentes para as quais foi explorada a associação com *G. duodenalis*.

<b>Variável dependente</b>	<b>Variáveis independentes</b>
<u>1. Infecção por <i>G. duodenalis</i></u>	Grupo etário, sexo, aleitamento materno, escolaridade da mãe, escolaridade do pai, fonte de água de consumo, tratamento da água, saneamento, resíduos sólidos urbanos (RSU), número de divisões da habitação, densidade de pessoas na habitação e infecção pelo VIH.
1.1. Infecção total por <i>G. duodenalis</i>	
1.2. Infecção simples por <i>G. duodenalis</i>	
<u>2. Infecção pelos genótipos de <i>G. duodenalis</i></u>	Grupo etário, sexo, aleitamento materno, densidade de pessoas na habitação e infecção pelo VIH.
2.1. Genótipo A	
2.2. Genótipo B	
<u>3. Sintomatologia</u>	Infecção total por <i>G. duodenalis</i> , infecção simples por <i>G. duodenalis</i> e infecção pelo genótipo B de <i>G. duodenalis</i> .
3.1. Desnutrição	
3.1.1. Desnutrição por baixo peso	
3.1.2. Desnutrição crónica	
3.1.3. Desnutrição aguda	
3.2. Diarreia	
3.2.1. Duração da diarreia	
3.2.2. Número de dejeções por dia	
3.2.3. Diarreia aquosa	
3.3. Outros sintomas	
3.3.1. Vômitos	
3.3.2. Febre	
3.3.3. Dor abdominal	
3.3.4. Falta de apetite	

## **2.9. Considerações éticas**

Apenas participaram no estudo as crianças cujos pais ou cuidadores assinaram o consentimento informado (Anexo I). Nos casos em que os pais ou cuidadores não sabiam ler fez-se a leitura em voz alta e obteve-se a impressão digital dos mesmos e a assinatura por parte de uma testemunha. A confidencialidade de todas as informações adquiridas foi garantida, através de um código atribuído a cada criança.

O presente estudo foi aprovado pelo Concelho de Ética do IHMT, bem como pelo Comité Nacional de Bioética para a Saúde do Ministério da Saúde de Moçambique.



### ***3 Resultados***



### 3.1 Caracterização sociodemográfica

Neste estudo foram incluídas crianças internadas nas enfermarias das diarreias (ED) e malnutrição (EM) ou frequentadoras das consultas externas da malnutrição (CM) e VIH (CH) do HCN. Das 831 crianças incluídas, 335 encontravam-se internadas na ED e 274 na EM, 104 eram frequentadoras da CM e 118 da CH. A distribuição dos sexos foi relativamente equilibrada, sendo que 55,4 % (460/831) das crianças eram do sexo masculino (Tabela 3.1). As suas idades variavam entre os 2 e os 59 meses, sendo a média das idades de 20,1 meses. As crianças com idade inferior a 24 meses corresponderam a 72,0% (598/831) da população estudada, como se pode confirmar na Tabela 3.1 e 81,9% (681/831) estavam acompanhadas pela mãe (Tabela 3.1).

**Tabela 3.1** Características gerais das crianças incluídas no estudo: frequências relativas (%); frequências absolutas (n) e intervalos de confiança a 95% (IC95%).

	% (n)	IC95%
<b>Género (N=831)</b>		
Masculino	55,4 (460)	(52,0; 58,8)
Feminino	44,6 (371)	(41,2 48,0)
<b>Idade (meses) (N=831)</b>		
<12	33,5 (278)	(30,3; 36,7)
12-24	38,5 (320)	(35,2; 41,8)
24-36	15,4 (128)	(12,9; 17,9)
36-48	8,5 (71)	(6,6; 10,4)
48-60	4,1 (34)	(2,8; 5,4)
<b>Acompanhante (N=831)</b>		
Mãe	81,9 (681)	(79,3; 84,5)
Pai	5,8 (48)	(4,2; 7,4)
Avó	5,5 (46)	(3,9; 7,1)
Tia	3,6 (30)	(2,3; 4,9)
Irmãos	1,3 (11)	(0,5; 2,1)
Outros	1,8 (15)	(0,9; 2,7)

Em relação à escolaridade dos pais, os resultados apresentados estão categorizados de acordo com o Sistema Nacional de Educação Moçambicano (143) (Tabela 3.2) e foram consideradas as respostas dadas por outros acompanhantes que não a mãe ou o pai.

**Tabela 3.2** Escolaridade dos pais: frequências relativas (%); frequências absolutas (n) e intervalos de confiança a 95% (IC95%).

	% (n)	IC95%
<b>Escolaridade do pai (N=588)</b>		
Sem escolaridade	13,9 (82)	(11,1; 16,7)
Ensino primário (1º grau – 1ª-5ª classe)	9,2 (54)	(6,9; 11,5)
Ensino primário (2º grau – 6ª e 7ª classe)	16,8 (99)	(13,8; 19,8)
Ensino secundário (1º ciclo – 8ª-10ª classe)	28,4 (167)	(24,8; 32,0)
Ensino secundário (2º ciclo – 11ª e 12ª classe)	26,8 (158)	(23,2; 30,4)
Ensino superior	4,8 (28)	(3,1; 6,5)
<b>Escolaridade da mãe (N=774)</b>		
Sem escolaridade	21,7 (168)	(18,8; 24,7)
Ensino primário (1º grau – 1ª-5ª classe)	21,4 (166)	(18,5; 24,3)
Ensino primário (2º grau – 6ª e 7ª classe)	20,3 (157)	(17,5; 23,2)
Ensino secundário (1º ciclo – 8ª-10ª classe)	25,2 (195)	(22,1; 28,3)
Ensino secundário (2º ciclo – 11ª e 12ª classe)	10,9 (84)	(8,7; 13,1)
Ensino superior	0,5 (4)	(0,0; 1,0)

As crianças incluídas no estudo viviam em dois tipos principais de habitações: em palhotas, que são construções de bloco de matope (tipo de argila) (Figura 3.1a) e telhado de capim (plantas altas secas) (53,2%, 442/831) (Figura 3.1b), ou em casas de bloco de cimento ou de matope e telhado de chapa de zinco (41,3%, 343/831) (Figura 3.1c) (Tabela 3.3). Em relação ao número de divisões verificou-se que 86,5% (716/828) das habitações era caracterizada por menos de 4 divisões. O número de pessoas que

viviam na habitação era superior a seis em quase metade dos casos (43,1%, 357/828) (Tabela 3.3).



**Figura 3.1** Imagens representativas dos blocos de matope e tipo de habitações mais comuns no distrito de Nampula: a) bloco de matope; b) palhota; c) casa com telhado de chapa de zinco. (originais)

**Tabela 3.3** Características habitacionais: frequências relativas (%); frequências absolutas (n) e intervalos de confiança a 95% (IC95%).

	% (n)	IC95%
<b>Tipo de habitação (N=831)</b>		
Palhota	53,2 (442)	(49,8; 56,6)
Bloco/Zinco	41,3 (343)	(38,0; 44,6)
Moradia	2,5 (21)	(1,4; 3,6)
Apartamento	0,2 (2)	(0,0; 0,5)
Outro	2,8 (23)	(1,7; 3,9)
<b>Nº de divisões da habitação (N=828)</b>		
<2	14,6 (121)	(12,2; 17,0)
3	35,6 (295)	(32,3; 38,9)
4	36,2 (300)	(32,9; 39,5)
5	8,3 (69)	(6,4; 10,2)
>6	5,2 (43)	(3,7; 6,7)
<b>Nº de pessoas que vivem na habitação (N=828)</b>		
<3	15,6 (129)	(13,1; 18,1)
4	19,1 (158)	(16,4; 21,8)
5	22,2 (184)	(19,4; 25,0)
>6	43,1 (357)	(39,7; 46,5)
<b>Densidade de pessoas na habitação* (N=828)</b>		
<3	85,4 (707)	(83,0; 87,8)
≥3	14,6 (121)	(12,2; 17,0)

\*número de pessoas por divisão

Mais de 60% das crianças consumiam água canalizada (61,8%, 507/820), proveniente da rede pública (Tabela 3.4). Temos conhecimento de que nem todas possuíam canalização em casa, mas abasteciam-se em casas de familiares ou vizinhos que possuíam água canalizada. Apenas uma pequena proporção das crianças (7,1%, 59/820) consumia água mineral (Tabela 3.4). Cerca de metade das pessoas inquiridas

respondeu não tratar a água (50,5%, 384/760) e das que procediam ao seu tratamento optavam na sua maioria por utilizar lixívia (27,0%, 205/760) (Tabela 3.4).

**Tabela 3.4** Acesso e tratamento da água de consumo: frequências relativas (%); frequências absolutas (n) e intervalos de confiança a 95% (IC95%).

	% (n)	IC95%
<b>Fonte de água de consumo (N=820)</b>		
Canalizada	61,8 (507)	(58,5; 65,1)
Poço	15,5 (129)	(13,0; 18,0)
Fontenário	9,6 (80)	(7,6; 11,6)
Mineral	7,1 (59)	(5,3; 8,9)
Canalizada e Poço	2,9 (24)	(1,8; 4,0)
Canalizada e Mineral	1,7 (14)	(0,8; 2,6)
Canalizada e Fontenário	0,4 (3)	(0,0; 0,8)
Poço e Fontenário	0,2 (2)	(0,0; 0,5)
Fontenário e Mineral	0,1 (1)	(0,0; 0,3)
Canalizada, Fontenário e Mineral	0,1 (1)	(0,0; 0,3)
<b>Tratamento da água (N=760)</b>		
Sem tratamento	50,5 (384)	(46,9; 54,1)
Lixívia	27,0 (205)	(23,8; 30,2)
Fervura	19,5 (148)	(16,7; 22,3)
Fervura e Lixívia	2,9 (22)	(1,7; 4,1)
Outro (Filtro)	0,1 (1)	(0,0; 0,3)

Relativamente ao saneamento, 85,5% (704/824) dos inquiridos respondeu que utilizava ou latrina melhorada ou de fossa aberta (Figura 3.2), em proporções idênticas (44,2%, 364/824 e 41,3%, 340/824, respetivamente) (Tabela 3.5). Apenas uma percentagem muito reduzida de indivíduos respondeu utilizar retrete (4,2%, 34/824), como se pode verificar na Tabela 3.5. Para a gestão dos resíduos sólidos urbanos (RSU) a maioria dos que responderam a esta pergunta optava por deitar o lixo doméstico em contentores longe de casa (47,1%, 391/831) ou ao ar livre, igualmente longe de casa (41,2%, 342/831) (Figura 3.3) (Tabela 3.5).



**Figura 3.2** Imagens representativas das latrinas de fossa aberta (a) e melhorada (b). (originais)



**Figura 3.3** Imagem representativa do local de despejo dos resíduos sólidos urbanos: a) ar livre e b) contentor. (originais)



**Tabela 3.5** Condições de higiene e saneamento: frequências relativas (%); frequências absolutas (n) e intervalos de confiança a 95% (IC95%).

	% (n)	IC95%
<b>Saneamento (N=824)</b>		
Latrina melhorada	44,2 (364)	(40,8; 47,6)
Latrina fossa aberta	41,3 (340)	(37,9; 44,7)
Ar livre	6,2 (51)	(4,6; 7,8)
Ar livre e latrina de fossa aberta	4,2 (35)	(2,8; 5,6)
Retrete sem autoclismo	2,7 (22)	(1,6; 3,8)
Retrete com autoclismo	1,5 (12)	(0,7; 2,3)
<b>Resíduos sólidos urbanos (RSU) (N=831)</b>		
Contentor longe de casa	47,1 (391)	(43,7; 50,5)
Ar livre longe de casa	41,2 (342)	(37,9; 44,5)
Ar livre perto de casa	11,7 (97)	(9,5; 13,9)
Contentor perto de casa	0,1 (1)	(0,0; 0,3)

### 3.2 Avaliação nutricional

No momento da colheita das amostras mais de metade das crianças não estava a ser amamentada (52,2%, 420/804) e apenas 2,9% (23/804) tinham aleitamento materno exclusivo (Tabela 3.6).

Os valores de desnutrição para qualquer um dos tipos (baixo peso, desnutrição crónica e desnutrição aguda) demonstraram ser muito elevados, entre os 71,6% (594/830) (desnutrição aguda) e os 82,5% (616/747) (baixo peso). Além disso, a forma grave de desnutrição foi a mais prevalente independentemente do tipo de desnutrição, com 46,5% (347/747), 37,5% (311/830) e 38,4% (319/830) para o baixo peso, desnutrição crónica e desnutrição aguda, respetivamente (Tabela 3.6).

**Tabela 3.6** Aleitamento materno e dados antropométricos das crianças incluídas no estudo: frequências relativas (%); frequências absolutas (n) e intervalos de confiança a 95% (IC95%).  
BP – baixo peso, DC – desnutrição crónica, DA – desnutrição aguda.

	% (n)	IC95%
<b>Aleitamento materno (N=804)</b>		
Exclusivo	2,9 (23)	(1,3; 4,5)
Não exclusivo	44,9 (361)	(40,1; 49,7)
Sem aleitamento	52,2 (420)	(47,3; 57,1)
<b>Edema (N=831)</b>		
Sim	10,1 (84)	(8,1; 12,1)
Não	89,9 (747)	(87,9; 91,9)
<b>Peso-para-idade (BP) (N=747)</b>		
Desnutrição (z-score < -1)	82,5 (616)	(79,8; 85,2)
Grave (z-score < -3)	46,5 (347)	(42,9; 50,1)
Moderado (-3 < z-score < -2)	18,9 (141)	(16,1; 21,7)
Ligeiro (-2 < z-score < -1)	17,1 (128)	(14,4; 19,8)
Eutrofia (z-score > -1)	17,5 (131)	(14,8; 20,2)
<b>Comprimento/estatura-para-idade (DC) (N=830)*</b>		
Desnutrição (z-score < -1)	79,0 (656)	(76,2; 81,8)
Grave (z-score < -3)	37,5 (311)	(34,2; 40,8)
Moderado (-3 < z-score < -2)	22,7 (188)	(19,9; 25,5)
Ligeiro (-2 < z-score < -1)	18,9 (157)	(16,2; 21,6)
Eutrofia (z-score > -1)	21,0 (174)	(18,2; 23,8)
<b>Peso-para-comprimento/estatura (DA) (N=830)*#</b>		
Desnutrição (z-score < -1)	71,6 (594)	(68,5; 74,7)
Grave (z-score < -3) <sup>#</sup>	38,4 (319)	(35,1; 41,7)
Moderado (-3 < z-score < -2)	16,0 (133)	(13,5; 18,5)
Ligeiro (-2 < z-score < -1)	17,1 (142)	(14,5; 19,7)
Eutrofia (z-score > -1)	28,4 (236)	(25,3; 31,5)

\* Não se conseguiu obter o comprimento/estatura de uma criança.

<sup>#</sup> Foram incluídas as crianças com edema, uma vez que correspondem a casos de desnutrição aguda grave.

### **3.3 Dados clínicos**

Mais de metade das crianças apresentava diarreia no momento da colheita de amostras (56,2%, 467/831) (Tabela 3.7). Adicionalmente, 86,5% (403/466) dos cuidadores referiram que a diarreia durava há três dias ou mais, 78,4% (364/464) que as crianças tinham três ou mais dejeções por dia e sensivelmente um terço das crianças (33,1%, 274/829) tinha tido esta manifestação clínica nos três meses anteriores (Tabela 3.7). A diarreia aquosa e/ou mucosa foram os tipos de diarreia mais comuns (Tabela 3.7).

Em relação à desparasitação, 41,6% (230/553) das crianças foram desparasitadas em algum momento desde o seu nascimento (Tabela 3.7).

**Tabela 3.7** Diarreia e desparasitação nas crianças incluídas no estudo: frequências relativas (%); frequências absolutas (n) e intervalos de confiança a 95% (IC95%).

	% (n)	IC95%
<b>Diarreia (N=831)</b>		
Sim	56,2 (467)	(52,8; 59,6)
Não	43,8 (364)	(40,4; 47,2)
<b>Duração da diarreia (N=466)</b>		
< 3 dias	13,5 (63)	(11,2; 15,8)
≥ 3 dias	86,5 (403)	(84,2; 88,8)
<b>Número de dejeções por dia (N=464)</b>		
< 3 dejeções	21,6 (100)	(18,8; 24,4)
≥ 3 dejeções	78,4 (364)	(75,6; 81,2)
<b>Tipo de diarreia (N=464)</b>		
Aquosa	37,9 (315)	(34,6; 41,2)
Mucosa	40,0 (332)	(36,7; 43,3)
Sanguinolenta	3,9 (32)	(2,6; 5,2)
<b>Diarreia nos últimos 3 meses (N=829)</b>		
Sim	33,1 (274)	(29,9; 36,3)
Não	66,8 (555)	(63,6; 70,0)
<b>Desparasitação (N=553)*</b>		
Sim	41,6 (230)	(37,5; 45,7)
Não	0,9 (5)	(0,1; 1,7)
Não sabe/Não lembra	57,5 (318)	(53,4; 61,6)

\*De acordo com as directrizes da OMS, para efeitos de desparasitação apenas foram consideradas as crianças com idades superiores a 12 meses (144).

No que diz respeito aos sintomas considerados no questionário, a dor abdominal, a falta de apetite e a tosse foram os mais frequentemente citados (43,9%, 365/831, 50,8%, 422/831 e 52,1%, 433/831, respetivamente) (Tabela 3.8).

A maioria das crianças (54,5%, 452/831) apresentava níveis de hemoglobina compatíveis com anemia e o grau moderado foi o mais comum (32,9%, 273/831) (Tabela 3.8)

**Tabela 3.8** Outros sintomas e sinais além da diarreia: frequências relativas (%); frequências absolutas (n) e intervalos de confiança a 95% (IC95%).

	% (n)	IC95%
<b>Outros sintomas e sinais (N=831)</b>		
Vômitos	23,7 (197)	(20,8; 26,6)
Febre	34,9 (290)	(31,7; 38,1)
Dor abdominal	43,9 (365)	(40,5; 47,3)
Falta de apetite	50,8 (422)	(47,4; 54,2)
Tosse	52,1 (433)	(48,7; 55,5)
Anemia (g/l)*		
Grave (<70)	10,0 (83)	(8,0; 12,0)
Moderada (70-99)	32,9 (273)	(29,7; 36,1)
Ligeira (100-109)	11,6 (96)	(9,4; 13,8)
Sem anemia (<110)	11,7 (97)	(9,5; 13,9)
Sem informação	33,9 (282)	(30,7; 37,1)

\* De acordo com as diretrizes da OMS apenas foram consideradas as crianças a partir dos 6 meses de idade (145).

Das crianças testadas para a infecção pelo VIH, 26,6% (221/831) apresentaram anticorpos contra este vírus, das quais cerca de 60% (133/221) fazia terapia antirretroviral (TARV) (Tabela 3.9).

Em relação a outras patologias registadas no processo clínico de cada criança, a malária foi a que se revelou mais frequentemente (19,2%, 134/698) (Tabela 3.9).

**Tabela 3.9** Infecção pelo VIH e outras patologias: frequências relativas (%); frequências absolutas (n) e intervalos de confiança a 95% (IC95%).

	% (n)	IC95%
<b>VIH (N=831)</b>		
Sim*	26,6 (221)	(23,6; 29,6)
Não	30,1 (250)	(27,0; 33,2)
Sem informação	43,3 (360)	(39,9; 46,7)
<b>TARV (N=221)</b>		
Sim	60,2 (133)	(53,7; 66,7)
Não	30,8 (68)	(24,7; 36,9)
Sem informação	9,0 (20)	(5,2; 12,8)
<b>Outras patologias</b>		
Malária (N=698)	19,2 (134)	(13,4; 18,8)
Infeções respiratórias (N=811)	2,8 (23)	(1,7; 3,9)
Tuberculose (N=812)	0,4 (3)	(0,0; 0,8)
Meningite (N=812)	0,0 (0)	(0,0; 0,0)

\*Apenas foram considerados os casos de infecção pelo VIH confirmados por diagnóstico laboratorial (imunocromatográfico e/ou molecular).

### 3.4 Diagnóstico parasitológico

Apesar do diagnóstico parasitológico ter sido realizado através da microscopia ótica, para o caso da deteção e identificação de *G. duodenalis* recorreu-se à utilização de testes imunocromatográficos para deteção de antígeno, tal como descrito na seção do material e métodos (2.6.2).

As infeções mistas detetadas representaram 3,8% (32/831) do total das infeções. Além disso, as infeções por protozoários intestinais foram notoriamente mais comuns (Tabela 3.10 e 3.11). *G. duodenalis* (23,9%, 199/831 pela microscopia e TDR; 13,1%, 109/831 pela microscopia apenas) foi o parasita intestinal patogénico mais frequentemente detetado nas amostras de fezes estudadas, seguido pelo helminta *S. stercoralis* (4,1%, 34/831) e pelo protozoário oportunista *Cryptosporidium* sp. (3,4%, 28/831), com frequências de infeção muito inferiores à de *G. duodenalis* (Tabela 3.11).

Outros parasitas intestinais patogênicos identificados encontram-se descritos na Tabela 3.11.

**Tabela 3.10** Tipo de infecção e tipo de parasitas intestinais patogênicos diagnosticados: frequências relativas (%); frequências absolutas (n) e intervalos de confiança a 95% (IC95%).

	% (n)	IC95%
<b>Infeções simples (N=831)</b>	27,7 (230)	(24,7; 30,7)
Helmintas	4,7 (39)	(3,3; 6,1)
Protozoários*	23,0 (191)	(20,1; 25,9)
<b>Infeções mistas (N=831)</b>	3,8 (32)	(2,5; 5,1)
Helmintas	0,5 (4)	(0,0; 1,0)
Protozoários*	1,3 (11)	(0,5; 2,1)
Helmintas e Protozoários*	2,0 (17)	(1,0; 3,0)
<b>Sem infecção (N=831)</b>	68,5 (569)	(65,3; 71,7)

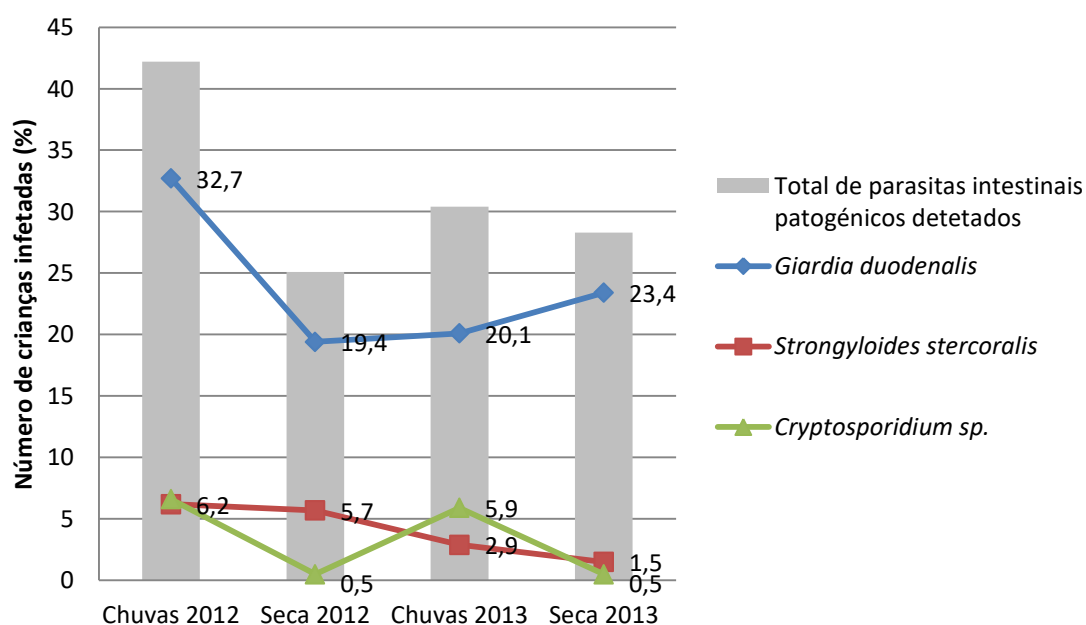
\* Incluídos todos os resultados com identificação positiva de *G. duodenalis* obtidos através dos TDR.

**Tabela 3.11** Parasitas intestinais patogênicos identificados: frequências relativas (%); frequências absolutas (n) e intervalos de confiança a 95% (IC95%).

Parasitas intestinais	% (n)	IC95%
<i>Giardia duodenalis</i> *	23,9 (199)	(20,9; 26,7)
<i>Strongyloides stercoralis</i>	4,1 (34)	(2,8; 5,4)
<i>Cryptosporidium</i> sp.	3,4 (28)	(2,2; 4,6)
<i>Ascaris lumbricoides</i>	1,6 (13)	(0,7; 2,5)
Ancilostomatídeos	1,2 (10)	(0,5; 1,9)
<i>Trichuris trichiura</i>	0,6 (5)	(0,1; 1,1)
<i>Entamoeba histolytica/dispar</i>	0,4 (3)	(0,0; 0,8)
<i>Hymenolepis diminuta</i>	0,2 (2)	(0,0; 0,5)
<i>Cyclospora belli</i>	0,1 (1)	(0,0; 0,3)
<i>Hymenolepis nana</i> (syn. <i>Rodentolepis nana</i> )	0,1 (1)	(0,0; 0,3)
Total	35,4 (294)	(32,1; 38,7)

\* Incluídos os resultados com identificação positiva obtidos através dos TDR.

A Figura 3.4. ilustra a variação das frequências de infecção dos parasitas intestinais mais frequentes (*G. duodenalis*, *S. stercoralis* e *Cryptosporidium* sp.) nas diferentes épocas de colheita das amostras de fezes, comparativamente com a frequência total de parasitas intestinais patogénicos detetados por época de colheita. Verificou-se uma frequência total de parasitas intestinais de 42,2% (89/211), 25,1% (53/211), 30,9% (63/204) e 28,3% (58/205) para a época das chuvas de 2012, seca de 2012, chuvas de 2013 e seca de 2013, respetivamente. *G. duodenalis* foi mais prevalente na época das chuvas de 2012 (32,7%, 69/211), com valores inferiores para as restantes épocas (19,4%, 41/211; 20,1%, 41/204 e 23,4%, 48/205 para a época seca de 2012, chuvas de 2013 e seca de 2013, respetivamente). Para a infecção por de *S. stercoralis* verificou-se uma frequência de 6,2% (13/211), 5,7% (12/211), 2,9% (6/204) e 1,5% (3/205) para as chuvas e seca de 2012 e chuvas e seca de 2013, respetivamente. *Cryptosporidium* sp parece ser o parasita que apresenta uma variação sazonal, com valores de infecção de 6,2% (14/211), 0,5% (1/211), 2,9% (12/204) e 0,5% (1/205) para as chuvas e seca de 2012 e chuvas e seca de 2013, respetivamente.

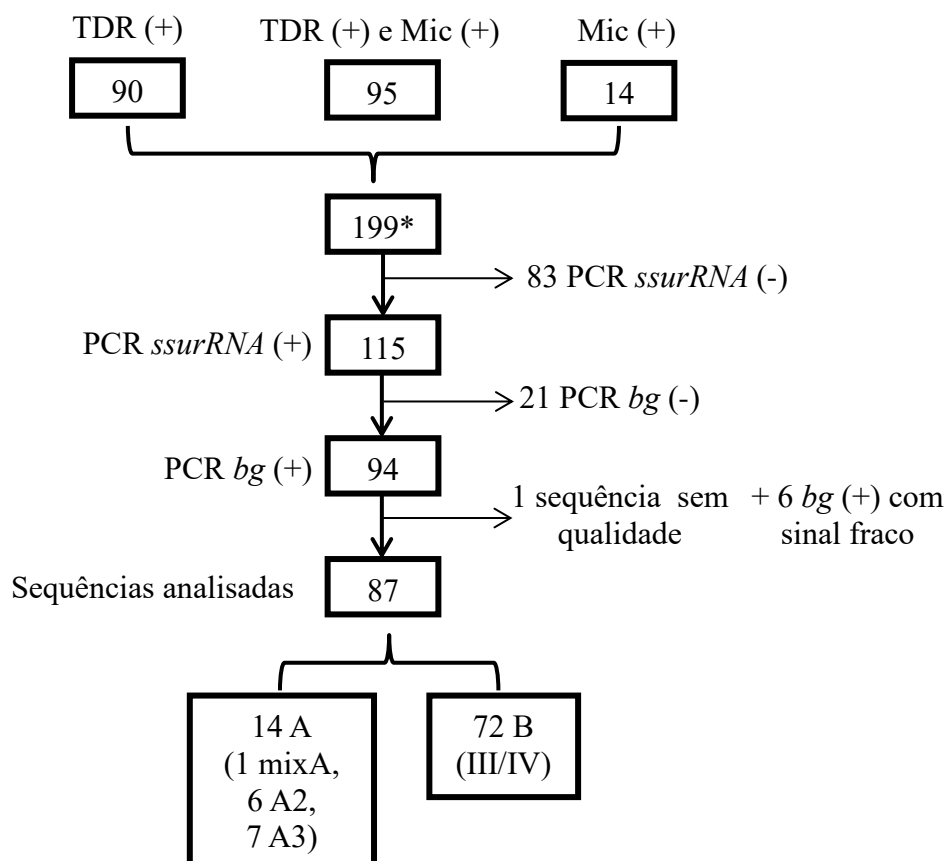




**Figura 3.4** Gráfico representativo da percentagem total de infeções por parasitas intestinais patogénicos e da infeção por *G. duodenalis* (microscopia e TDR), *S. stercoralis* e *Cryptosporidium* sp., de acordo com o ano e época de colheita das amostras de fezes.

### **3.5 Análise molecular de *G. duodenalis***

De entre as 199 amostras com identificação positiva para *G. duodenalis*, quer pela microscopia (7,0%, 14/199), quer pela deteção de antígeno parasitário através do TDR (45,2%, 90/199), ou por ambos (47,7%, 95/199), 115 (57,8%) foram amplificadas com sucesso para o gene do *ssurRNA* (Figura 3.5). De entre estas amostras, 94 (81,7%) foram amplificadas para o gene *bg*, cujos produtos de amplificação foram sequenciados para posterior análise genotípica. Posteriormente foi possível obter 87 (92,6%) sequências, das quais 72 (82,8%) pertenciam ao genótipo B, 14 (16,1%) ao genótipo A, além de uma sequência que parece resultar de uma mistura de genótipos devido às inúmeras substituições nucleotídicas observadas a nível do cromatograma (Figura 3.5).



**Figura 3.5** Fluxograma da análise das amostras de fezes com identificação positiva para *G. duodenalis*, desde a microscopia (Mic) e utilização de testes de detecção rápida (TDR) à análise molecular (PCR *ssurRNA* e *bg*) e consequente genotipagem.

\* Uma amostra não foi analisada pela técnica de PCR.

A análise dos polimorfismos de posição (SNP, *single nucleotide polymorphism*) permitiu a identificação de 14/87 (16,1%) isolados pertencentes ao genótipo A, e dentro deste a distinção dos subgenótipos. Deste modo, seis (6,9%, 6/87) isolados foram identificados como pertencendo ao subgenótipo A2 e sete (8,0%, 7/87) ao subgenótipo A3. Adicionalmente, um isolado parece ser uma mistura de subgenótipos A2+A6 ou A3+A6 (172.CH.12C) (Tabela 3.12)

**Tabela 3.12** Substituições nucleotídicas no gene *bg* para os isolados do genótipo A de *G. duodenalis*, de acordo com as posições polimórficas descritas por Cacciò et al (2008). Y= C/T; R=A/G.

Isolado	Subgenótipo	162	255	354	378	411	421	429	444	462	502	534	564	567	582	690
	A1	C	C	T	T	C	C	T	T	A	G	G	T	C	A	A
	A2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	G
	A3	.	.	.	.	.	T	C	.	.	.	.	.	T	.	G
	A4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.
	A5	T	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	A6	.	T	C	C	.	.	C	C	G	.	A	C	.	G	.
<b>76.CH.12C</b>	<b>A3</b>	.	.	.	.	.	<b>T</b>	<b>C</b>	.	.	.	.	.	<b>T</b>	.	n.a.
<b>127.CH.12C</b>	<b>A2</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	<b>T</b>	.	n.a.
<b>130.CM.12C</b>	<b>A3</b>	.	.	.	.	.	<b>T</b>	<b>C</b>	.	.	.	.	.	.	.	n.a.
<b>156.CH.12C</b>	<b>A2</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	<b>T</b>	.	n.a.
<b>172.CH.12C</b>	<b>mix A</b>	.	.	<b>C</b>	<b>C</b>	.	<b>Y</b>	<b>Y</b>	.	.	.	.	.	<b>T</b>	.	n.a.
<b>184.EM.12C</b>	<b>A3</b>	.	.	.	.	.	<b>T</b>	<b>C</b>	.	.	.	.	.	<b>T</b>	.	n.a.
<b>196.CH.12C</b>	<b>A3</b>	.	.	.	.	.	<b>T</b>	<b>C</b>	.	.	.	.	.	<b>T</b>	.	n.a.
<b>255.CM.12S</b>	<b>A3</b>	.	.	.	.	.	<b>T</b>	<b>C</b>	.	.	.	.	.	<b>T</b>	.	n.a.
<b>418.CH.12S</b>	<b>A2</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	<b>T</b>	.	n.a.
<b>423.CH.12S</b>	<b>A3</b>	.	.	.	.	.	<b>T</b>	<b>C</b>	.	.	.	.	.	<b>T</b>	.	n.a.
<b>444.EM.13C</b>	<b>A2</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	<b>T</b>	.	n.a.
<b>513.EM.13C</b>	<b>A2</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	<b>T</b>	.	n.a.
<b>540.ED.13C</b>	<b>A3</b>	.	.	.	.	.	<b>T</b>	<b>C</b>	.	.	.	.	.	<b>T</b>	.	n.a.
<b>759.EM.13S</b>	<b>A2</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	<b>T</b>	.	n.a.

A numeração das posições representa a distância do codão ATG da estirpe de referência *Portland-1* (nº de acesso no GenBank<sup>TM</sup> X14185).

A análise dos *SNPs* não permitiu distinguir os subgenótipos BIII e BIV do genótipo B (Tabela 3.13). Devido a esse facto, nos isolados pertencentes ao genótipo B verificou-se a existência de alterações nucleotídicas compatíveis com o subgenótipo BIII e outras compatíveis com o subgenótipo BIV na mesma sequência, para todos os isolados. Para além disso, outras posições, que não foram descritas por este investigador, foram identificadas nos isolados obtidos neste estudo (Tabela 3.14). As posições 189 e 570 parecem ser muito polimórficas, sendo que 37 isolados não apresentam o nucleótido A, descrito para a posição 189 para ambas as sequências referência (BIII e BIV, (74)), mas o G (26 isolados) ou o nucleótido degenerado R (A/G) (11 isolados). No caso da posição 570, identificaram-se 25 isolados que não apresentam o nucleótido C, descrito para esta posição para ambas as sequências referência (BIII e BIV, (74)), mas o T (12 isolados) ou o nucleótido degenerado Y (C/T) (13 isolados). Em três isolados sequenciados (3,4%, 3/87) (50.CM.12C; 205.EM.12C; 334.CH.12S) não se obtiveram sequências com qualidade suficiente para a determinação a nível do subgenótipo, devido a um elevado ruído de fundo observado nos respetivos cromatogramas, no final das sequências para ambos os sentidos (direto e reverso). No entanto, foi possível chegar à conclusão de que pertenciam ao genótipo B através da comparação com as sequências depositadas no GenBank<sup>TM</sup>.

**Tabela 3.13** Substituições nucleotídicas no gene *bg* para os isolados do genótipo B de *G. duodenalis*, de acordo com as posições polimórficas descritas por Cacciò *et al* (74). Y= C/T

Isolado	171	234	288	315	318	330	399	525	579
BIII (ref)	C	G	C	C	C	C	C	T	T
BIV (ref)	T	A	T	T	T	C	T	T	T
005.ED.12C	.	A	.	T	T	.	.	C	A
010.CH.12C	.	A	.	T	T	.	.	Y	A
033.CH.12C	.	A	.	T	T	.	.	.	A
041.CH.12C	.	A	.	Y	T	.	.	C	A
042.ED.12C	.	A	.	Y	T	.	.	Y	A
052.CM.12C	.	A	.	T	T	.	.	.	A
065.CM.12C	.	A	.	T	T	.	.	.	A
083.CM.12C	.	A	.	T	T	.	.	.	A
094.CH.12C	.	A	.	.	T	.	.	.	A

Isolado	171	234	288	315	318	330	399	525	579
BIII (ref)	C	G	C	C	C	C	C	T	T
BIV (ref)	T	A	T	T	T	C	T	T	T
104.CM.12C	.	A	.	.	T	.	.	.	A
107.CM.12C	.	A	.	Y	T	.	.	Y	A
112.CM.12C	.	A	.	Y	T	.	.	.	A
126.CH.12C	Y	A	.	T	T	.	.	Y	A
129.CM.12C	.	.	.	.	T	.	.	.	A
131.CH.12C	.	A	.	T	T	.	.	.	A
143.CM.12C	.	A	.	T	T	.	.	Y	A
148.ED.12C	.	A	.	.	T	.	.	.	A
154.CH.12C	.	A	.	.	T	.	.	.	A
155.CH.12C	.	A	.	.	T	T	.	.	A
159.ED.12C	.	A	.	T	T	.	.	.	A
171.CH.12C	.	A	.	.	T	.	.	.	A
172.CH.12C	.	.	.	T	G	.	.	C	A
177.CH.12C	.	A	.	.	T	.	.	.	A
180.CH.12C	.	A	.	T	T	.	.	.	A
183.EM.12C	.	A	.	T	T	.	.	C	A
187.CH.12C	.	A	.	T	T	.	.	Y	A
197.CH.12C	.	A	.	Y	T	.	.	Y	A
209.CH.12C	.	A	.	T	T	.	.	.	A
227.EM.12S	T	A	.	T	T	.	.	.	A
251.EM.12S	.	A	.	Y	T	.	.	Y	A
254.EM.12S	.	A	.	Y	T	.	.	.	A
256.CM.12S	T	A	.	.	T	.	.	.	A
269.CH.12S	T	A	.	Y	T	.	.	.	A
285.ED.12S	.	A	.	.	T	.	.	.	A
297.CM.12S	.	A	.	T	T	.	.	C	A
300.CH.12S	.	A	.	T	T	.	.	C	A
321.CH.12S	.	A	.	T	T	.	.	.	A
324.CM.12S	.	A	.	T	T	.	.	C	A
355.CM.12S	.	A	.	.	T	.	.	Y	A
379.CM.12S	.	A	.	T	T	.	.	Y	A
386.EM.12S	.	A	.	Y	T	.	.	Y	A

Isolado	171	234	288	315	318	330	399	525	579
BIII (ref)	C	G	C	C	C	C	C	T	T
BIV (ref)	T	A	T	T	T	C	T	T	T
389.ED.12S	.	A	.	Y	T	.	.	Y	A
419.CH.12S	.	A	.	Y	T	.	.	.	A
440.EM.13C	.	A	.	T	T	.	.	.	A
445.CM.13C	.	A	.	T	T	.	.	.	A
448.CM.13C	.	A	.	T	T	.	.	C	A
465.CM.13C	.	A	.	Y	T	.	.	.	A
494.EM.13C	Y	A	.	Y	T	.	.	.	A
504.ED.13C	.	A	.	T	T	.	.	C	A
512.EM.13C	.	A	.	Y	T	.	.	Y	A
527.EM.13C	.	A	.	.	T	.	.	.	A
543.CM.13C	.	A	.	T	T	.	.	.	A
548.EM.13C	.	A	.	.	T	.	.	.	A
582.EM.13C	T	A	.	T	T	.	.	.	A
587.CH.13C	.	A	.	T	T	.	.	.	A
602.EM.13C	.	A	.	T	T	.	.	.	A
615.EM.13C	.	A	.	.	T	.	.	.	A
619.EM.13C	.	A	.	T	T	.	.	.	A
649.ED.13S	.	A	.	.	T	.	.	.	A
674.EM.13S	T	A	.	T	T	.	.	.	A
689.ED.13S	.	A	.	T	T	.	.	C	A
697.EM.13S	.	A	.	.	T	.	.	Y	A
713.EM.13S	T	A	.	T	T	.	.	.	A
716.EM.13S	.	R	.	T	T	.	.	.	A
725.EM.13S	.	A	.	T	T	.	.	C	A
750.ED.13S	.	A	.	T	T	.	.	.	A
780.CM.13S	.	A	.	Y	T	.	.	.	A
784.ED.13S	.	A	.	.	T	.	.	.	A
795.ED.13S	.	A	.	T	T	.	.	.	A
835.EM.13S	.	A	.	.	T	.	.	.	A

A numeração das posições representa a distância do codão ATG da estirpe de referência *Portland-1* (nº de acesso no GenBank<sup>TM</sup> X14185).

$$Y = C/T; R = A/G; M = A/C.$$
[illegible]

[illegible]



	123	162	189	204	210	220	246	261	264	285	289	294	365	372	385	426	429	456	465	477	510	549	561	570
BIII (ref)	C	C	A	C	C	G	T	C	G	C	A	C	C	C	G	C	C	C	G	T	C	C	C	C
321.CH.12S	Y	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
355.CM.12S	.	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	.	.
419.CH.12S	.	.	R	Y	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
465.CM.13C	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T
835.EM.13S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Y
010.CH.12C	.	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	.	.	Y
041.CH.12C	.	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	T
065.CM.12C	T	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
094.CH.12C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	.	T	.	.	.	T	.	.
143.CM.12C	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	T
297.CM.12S	.	.	G	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T
379.CM.12S	.	.	R	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Y
386.EM.12S	.	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	.	Y
750.ED.13S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

A numeração das posições representa a distância do codão ATG da estirpe de referência *Portland-1* (nº de acesso no GenBank<sup>TM</sup> X14185).

## 3.6 Estudos de associação

### 3.6.1 Infecção por *G. duodenalis*

#### 3.6.1.1 Infecção total por *G. duodenalis*

Nas Tabelas 3.15 a 3.19 encontram-se os resultados correspondentes às associações exploradas para a variável dependente “infecção total por *G. duodenalis*”, que inclui quer as infecções mistas com outros parasitas intestinais, quer as infecções simples por *G. duodenalis*.

**Tabela 3.15** Exploração da associação entre a variável dependente infecção total por *G. duodenalis* (simples e mista) e as variáveis independentes, grupo etário, sexo e estado do aleitamento materno no momento do estudo.

	n	% (n)	IC95%	<i>p</i>	ORbruto	IC95% (ORb)
<b>Grupo etário</b>	831					
< 24 meses	600	28,3 (170)	(25,2; 31,4)		ref	
24-59 meses	231	39,8 (92)	(36,5; 43,1)	0,149	1,292	(0,913; 1,828)
<b>Sexo</b>	831					
Feminino	371	30,5 (113)	(27,4; 33,6)	0,295	0,841	(0,609; 1,162)
Masculino	460	32,4 (149)	(29,2; 35,6)		ref	
<b>Aleitamento materno</b>	831					
Sem aleitamento	420	26,0 (109)	(23,0;29,0)	0,082	3,680	(0,849; 15,953)
Não exclusivo	361	22,2 (80)	(19,4; 25,0)	0,145	2,989	(0,686; 13,021)
Exclusivo	23	8,7 (2)	(6,8; 10,6)		ref	

n – número de respostas válidas (denominador); % (n) – percentagem e respetiva frequência absoluta das crianças com infecção total por *G. duodenalis* (simples ou mista); IC95% - intervalo de confiança a 95% da estimativa; *p* – refere-se à comparação da proporção entre as classes da variável; ORbruto – Odds Ratio bruto ou não ajustado; IC95% (ORb) – intervalo de confiança a 95% da estimativa do Odds Ratio bruto ou não ajustado; (ref.) – categoria de referência para o OR

A análise destas associações demonstrou que 39,8% (92/231) das crianças com idades superiores a 24 meses estavam infetadas por *G. duodenalis* (infecção simples ou mista), em comparação com 28,3% (170/600) das crianças com menos de 24 meses. Relativamente ao género observou-se que cerca de 30% das crianças estavam infetadas independentemente de pertencerem ao sexo feminino ou masculino (30,5%, 113/371 e 32,4%, 149/460, respetivamente). As crianças que não estavam a ser amamentadas no

momento do estudo apresentavam uma frequência de infecção de 26,0% (109/420) e as que tinham aleitamento materno não exclusivo de 22,2% (80/361), em oposição às 8,7% (2/23) que tinham aleitamento materno exclusivo (Tabela 3.15).

**Tabela 3.16** Exploração da associação entre a variável dependente infecção total por *G. duodenalis* (simples e mista) e as variáveis independentes, escolaridade da mãe e escolaridade do pai.

	n	% (n)	IC95%	<i>p</i>	ORbruto	IC95% (ORb)
<b>Escolaridade da mãe</b>	774					
Sem escolaridade	168	20,8 (35)	(18,0; 23,6)	0,344	0,801	(0,506; 1,268)
Ensino primário	323	24,1 (78)	(21,2; 27,0)	0,867	0,969	(0,668; 1,404)
Ensino secundário ou superior	283	24,7 (70)	(21,8; 27,6)		ref	
<b>Escolaridade do pai</b>	588					
Sem escolaridade	82	22,0 (18)	(19,2; 24,8)	0,889	0,960	(0,538; 1,713)
Ensino primário	153	24,2 (37)	(21,3; 27,1)	0,710	1,088	(0,697; 1,700)
Ensino secundário ou superior	353	22,7 (80)	(19,9; 25,5)		ref	

n – número de respostas válidas (denominador); % (n) – percentagem e respetiva frequência absoluta das crianças com infecção total por *G. duodenalis* (simples ou mista); IC95% - intervalo de confiança a 95% da estimativa; *p* – refere-se à comparação da proporção entre as classes da variável; ORbruto – Odds Ratio bruto ou não ajustado; IC95% (ORb) – intervalo de confiança a 95% da estimativa do Odds Ratio bruto ou não ajustado; (ref.) – categoria de referência para o OR

Para as variáveis “escolaridade da mãe” e “escolaridade do pai” os valores da infecção total por *G. duodenalis* foram muito semelhantes. As crianças com pais sem escolaridade tinham valores de infecção de 20,8% (35/168) e 22,0% (18/82), com ensino primário de 24,1% (78/323) e 24,2% (37/153) e com ensino secundário ou superior de 24,7% (70/283) e 22,7% (80/353), para a mãe e o pai, respetivamente (Tabela 3.16).

**Tabela 3.17** Exploração da associação entre a variável dependente infecção total por *G. duodenalis* (simples e mista) e as variáveis independentes, fonte de água de consumo, tratamento da água, saneamento e resíduos sólidos urbanos (RSU).

	n	% (n)	IC95%	<i>p</i>	ORbruto	IC95% (ORb)
<b>Fonte de água de consumo</b>	804					
Água mineral	59	18,6 (11)	(16,0; 21,2)		ref	
Outras fontes	745	24,6 (183)	(21,7; 27,5)	0,308	1,421	(0,723; 2,794)
<b>Tratamento da água de consumo</b>	760					
Sim	376	25,8 (97)	(22,8; 28,8)		ref	
Não	384	23,2 (89)	(20,3; 26,1)	0,401	0,808	(0,623; 1,208)
<b>Saneamento</b>	802					
Retrete	12	25,0 (3)	(22,1; 27,9)		ref	
Melhorada	364	24,2 (88)	(21,3; 27,1)	0,948	0,957	(0,253; 3,611)
Fossa aberta	340	23,8 (81)	(20,9; 26,7)	0,925	0,938	(0,248; 3,548)
Ar livre	51	23,5 (12)	(20,6; 26,4)	0,914	0,923	(0,215; 3,967)
Fossa aberta e ar livre	35	17,1 (6)	(14,5; 19,7)	0,553	0,621	(0,129; 2,998)
<b>RSU</b>	831					
Contentor	392	23,7 (93)	(20,8; 26,6)		ref	
Ar livre	439	23,9 (105)	(21,0; 26,8)	0,948	1,011	(0,734; 1,392)

n – número de respostas válidas (denominador); % (n) – percentagem e respetiva frequência absoluta das crianças com infecção total por *G. duodenalis* (simples ou mista); IC95% - intervalo de confiança a 95% da estimativa; *p* – refere-se à comparação da proporção entre as classes da variável; ORbruto – Odds Ratio bruto ou não ajustado; IC95% (ORb) – intervalo de confiança a 95% da estimativa do Odds Ratio bruto ou não ajustado; (ref.) – categoria de referência para o OR

No que diz respeito às crianças que consumiam água mineral, 18,6% (11/59) estavam infetadas por *G. duodenalis* e das que consumiam água tratada 25,8% (97/376) apresentavam infecção. Para a variável “saneamento” a percentagem de crianças parasitadas foi semelhante para as que usavam retrete (25,0%, 3/12), latrina melhorada (24,2%, 88/364), latrina de fossa aberta (23,8%, 81/340) ou praticavam defecação ao ar livre (23,5%, 12/51).

Relativamente à gestão dos resíduos sólidos urbanos, constatarem-se valores idênticos para a infeção por *G. duodenalis* total, com 23,7% (93/392) para quem usava contentor e 23,9% (105/439) para quem deitava o lixo ao ar livre (Tabela 3.17).

**Tabela 3.18** Exploração da associação entre a variável dependente infeção total por *G. duodenalis* (simples e mista) e as variáveis independentes, número de divisões da habitação e densidade de pessoas na habitação (número de pessoas por divisão).

	n	% (n)	IC95%	<i>p</i>	ORbruto	IC95% (ORb)
<b>Nº de divisões da habitação</b>	828					
<4	416	31,2 (130)	(28,0; 34,4)	0,932	1,014	(0,737; 1,395)
≥4	412	32,0 (132)	(28,8; 35,2)		ref	
<b>Densidade de pessoas na habitação</b>	828					
<3	707	22,6 (160)	(19,8; 25,4)		ref	
≥3	121	31,4 (38)	(28,2; 34,6)	<b>0,038</b>	1,565	(1,026; 2,388)

n – número de respostas válidas (denominador); % (n) – percentagem e respetiva frequência absoluta das crianças com infeção total por *G. duodenalis* (simples ou mista); IC95% - intervalo de confiança a 95% da estimativa; *p* – refere-se à comparação da proporção entre as classes da variável; ORbruto – Odds Ratio bruto ou não ajustado; IC95% (ORb) – intervalo de confiança a 95% da estimativa do Odds Ratio bruto ou não ajustado; (ref.) – categoria de referência para o OR

Quanto ao número de divisões da habitação observaram-se valores de infeção de 31,2% (130/416) para as crianças que viviam em habitações com menos de quatro divisões e de 32,0% (132/412) para as que viviam em habitações com quatro divisões ou mais. Por outro lado, verificou-se uma diferença na infeção por *G. duodenalis* total relativamente à densidade de pessoas na habitação, com 22,6% (160/707) das crianças que viviam em densidades inferiores a três pessoas por divisão parasitadas em oposição às 31,4% (38/121) que viviam em densidades iguais ou superiores a três (Tabela 3.18). Esta diferença foi estatisticamente significativa ( $p=0,038$ ) e verificou-se ainda que, as crianças que viviam em habitações com uma densidade igual ou superior a três pessoas por divisão apresentavam uma probabilidade maior de estarem infetadas por *G. duodenalis* (tanto para a infeção simples como para a mista), em relação às crianças que

viviam em habitações com uma densidade inferior a três pessoas por divisão (OR: 1,565; IC95% (OR): 1,026-2,388) (Tabela 3.18).

**Tabela 3.19** Exploração da associação entre a variável dependente infeção total por *G. duodenalis* (simples e mista) e a variável independente infeção pelo VIH.

	n	% (n)	IC95%	<i>p</i>	ORbruto	IC95% (ORb)
<b>VIH</b>	471					
Sim	221	26,7 (59)	(23,7; 29,7)	0,638	1,104	(0,730; 1,670)
Não	250	24,8 (62)	(21,9; 27,7)		ref	

n – número de respostas válidas (denominador); % (n) – percentagem e respetiva frequência absoluta das crianças com infeção total por *G. duodenalis* (simples ou mista); IC95% - intervalo de confiança a 95% da estimativa; *p* – refere-se à comparação da proporção entre as classes da variável; ORbruto – Odds Ratio bruto ou não ajustado; IC95% (ORb) – intervalo de confiança a 95% da estimativa do Odds Ratio bruto ou não ajustado; (ref.) – categoria de referência para o OR

O número de crianças infetadas pelo VIH e parasitadas (26,7%, 59/221) foi muito próximo do número de crianças sem infeção por este vírus e parasitadas (24,8%, 62/250) (Tabela 3.19).

Nenhuma das associações exploradas foi estatisticamente significativa, com exceção da associação com a variável independente “densidade de pessoas na habitação”, tal como descrito anteriormente.

### 3.6.1.2 Infeção simples por *G. duodenalis*

Nas Tabelas 3.20 a 3.24 encontram-se os resultados correspondentes às associações exploradas para a variável dependente “infeção simples por *G. duodenalis*”.

**Tabela 3.20** Exploração da associação entre a variável dependente infecção simples por *G. duodenalis* e as variáveis independentes, grupo etário, sexo e estado do aleitamento materno no momento do estudo.

	n	% (n)	IC95%	<i>p</i>	ORbruto	IC95% (ORb)
<b>Grupo etário</b>	831					
< 24 meses	600	22,9 (117)	(20,0; 25,8)		ref	
24-59 meses	231	19,5 (53)	(16,8; 22,2)	0,271	1,229	(0,851; 1,775)
<b>Sexo</b>	831					
Feminino	371	18,9 (70)	(16,2; 21,6)	0,308	0,837	(0,595; 1,178)
Masculino	460	21,7 (100)	(18,9; 24,5)		ref	
<b>Aleitamento materno</b>	831					
Não	420	21,4 (90)	(18,6; 24,2)	0,160	2,864	(0,659; 12,442)
Não exclusivo	361	20,2 (73)	(17,5; 22,9)	0,193	2,661	(0,610; 11,610)
Exclusivo	23	8,7 (2)	(6,8; 10,6)		ref	

n – número de respostas válidas (denominador); % (n) – percentagem e respetiva frequência absoluta das crianças com infecção simples por *G. duodenalis*; IC95% - intervalo de confiança a 95% da estimativa; *p* – refere-se à comparação da proporção entre as classes da variável; ORbruto – Odds Ratio bruto ou não ajustado; IC95% (ORb) – intervalo de confiança a 95% da estimativa do Odds Ratio bruto ou não ajustado; (ref.) – categoria de referência para o OR

As crianças com menos de 24 meses de idade apresentavam uma frequência de infecção simples por *G. duodenalis* de 22,9% (117/600), valor próximo ao das crianças com 24 meses ou mais (19,5%, 53/231). Em relação ao sexo das crianças verificou-se um padrão semelhante ao encontrado para o grupo etário (18,9%, 70/371 para o sexo feminino e 21,7%, 100/460 para o masculino). Das crianças sem aleitamento materno no momento do estudo 21,4% (90/420) estavam parasitadas, em contraste com as 8,7% (2/23) que recebiam aleitamento materno exclusivo (Tabela 3.20).

**Tabela 3.21** Exploração da associação entre a variável dependente infecção simples por *G. duodenalis* e as variáveis independentes, escolaridade da mãe e escolaridade do pai.

	n	% (n)	IC95%	<i>p</i>	ORbruto	IC95% (ORb)
<b>Escolaridade da mãe</b>	774					
Sem escolaridade	168	19,6 (33)	(16,9; 22,3)	0,569	0,871	(0,543; 1,399)
Ensino primário	323	19,8 (64)	(17,1; 22,5)	0,526	0,881	(0,595; 1,304)
Ensino secundário ou superior	283	21,9 (62)	(19,1; 24,7)		ref	
<b>Escolaridade do pai</b>	588					
Sem escolaridade	82	18,3 (15)	(15,7; 20,9)	0,796	0,921	(0,496; 1,711)
Ensino primário	153	20,3 (31)	(17,6; 23,0)	0,853	1,046	(0,651; 1,680)
Ensino secundário ou superior	353	19,5 (69)	(16,8; 22,2)		ref	

n – número de respostas válidas (denominador); % (n) – percentagem e respetiva frequência absoluta das crianças com infecção simples por *G. duodenalis*; IC95% - intervalo de confiança a 95% da estimativa; *p* – refere-se à comparação da proporção entre as classes da variável; ORbruto – Odds Ratio bruto ou não ajustado; IC95% (ORb) – intervalo de confiança a 95% da estimativa do Odds Ratio bruto ou não ajustado; (ref.) – categoria de referência para o OR

Em relação à escolaridade dos pais os valores de infecção foram semelhantes para os diferentes níveis de ensino, para ambos os pais (19,6%, 33/168 e 18,3%, 15/82 sem escolaridade; 19,8%, 64/323 e 20,3%, 31/153 com ensino primário; 21,9%, 62/283 e 19,5%, 69/353 com ensino secundário ou superior, para a escolaridade da mãe e do pai, respetivamente) (Tabela 3.21).



**Tabela 3.22** Exploração da associação entre a variável dependente infecção simples por *G. duodenalis* e as variáveis independentes, fonte de água de consumo, tratamento da água, saneamento e resíduos sólidos urbanos (RSU).

	n	% (n)	IC95%	<i>p</i>	ORbruto	IC95% (ORb)
<b>Fonte de água de consumo</b>	804					
Água mineral	59	18,6 (11)	(16,0; 21,2)		ref	
Outras fontes	745	20,8 (155)	(18,0; 23,6)	0,693	1,146	(0,582; 2,260)
<b>Tratamento da água de consumo</b>	760					
Sim	376	21,3 (80)	(18,5; 24,1)		ref	
Não	384	20,3 (78)	(17,6; 23,0)	0,743	0,943	(0,664; 1,339)
<b>Saneamento</b>	802					
Retrete	12	25,0 (3)	(22,1; 27,9)		ref	
Melhorada	364	20,3 (74)	(17,6; 23,0)	0,694	0,766	(0,202; 2,898)
Fossa aberta	340	20,9 (71)	(18,1; 23,7)	0,731	0,792	(0,209; 3,002)
Ar livre	51	21,6 (11)	(18,8; 24,4)	0,797	0,825	(0,190; 3,578)
Fossa aberta e ar livre	35	14,3 (5)	(11,9; 16,7)	0,400	0,500	(0,100; 2,510)
<b>RSU</b>	831					
Contentor	392	19,9 (78)	(17,2; 22,6)		ref	
Ar livre	439	21,0 (92)	(18,2; 23,8)	0,706	1,067	(0,761; 1,497)

n – número de respostas válidas (denominador); % (n) – percentagem e respetiva frequência absoluta das crianças com infecção simples por *G. duodenalis*; IC95% - intervalo de confiança a 95% da estimativa; *p* – refere-se à comparação da proporção entre as classes da variável; ORbruto – Odds Ratio bruto ou não ajustado; IC95% (ORb) – intervalo de confiança a 95% da estimativa do Odds Ratio bruto ou não ajustado; (ref.) – categoria de referência para o OR

Entre as crianças que consumiam água mineral e as que consumiam água a partir de outras fontes as percentagens de infecção foram idênticas (18,6%, 11/59 e 20,8%, 155/745, respetivamente), assim como para o tratamento da água de consumo (21,3%, 80/376 com tratamento e 20,3%, 78/384 sem tratamento). Em relação ao saneamento as frequências de infecção simples por *G. duodenalis* foram de 25,0% (3/12), 20,3% (74/364), 20,9% (71/340), 21,6% (11/51) e 14,3% (5/35) para o uso de retrete, latrina melhorada, latrina de fossa aberta, defecação ao ar livre e prática simultânea de latrina

de fossa aberta e defecação ao ar livre, de acordo com a ordem indicada. Valores idênticos foram observados para a infecção por *G. duodenalis* simples relativamente à gestão dos resíduos sólidos urbanos onde 19,9% (78/392) das pessoas usavam contentor e 21,0% (92/439) deitavam o lixo ao ar livre (Tabela 3.22).

**Tabela 3.23** Exploração da associação entre a variável dependente infecção simples por *G. duodenalis* e as variáveis independentes, número de divisões da habitação e densidade de pessoas na habitação (número de pessoas por divisão).

	n	% (n)	IC95%	<i>p</i>	ORbruto	IC95% (ORb)
<b>Nº de divisões da habitação</b>	828					
<4	416	21,4 (89)	(18,6; 24,2)	0,537	1,112	(0,794; 1,559)
≥4	412	19,7 (81)	(17,0; 22,4)		ref	
<b>Densidade de pessoas nas habitação</b>	828					
<3	707	19,5 (138)	(16,8; 22,2)		ref	
≥3	121	26,4 (32)	(23,4; 29,4)	0,083	1,482	(0,950; 2,313)

n – número de respostas válidas (denominador); % (n) – percentagem e respetiva frequência absoluta das crianças com infecção simples por *G. duodenalis*; IC95% - intervalo de confiança a 95% da estimativa; *p* – refere-se à comparação da proporção entre as classes da variável; ORbruto – Odds Ratio bruto ou não ajustado; IC95% (ORb) – intervalo de confiança a 95% da estimativa do Odds Ratio bruto ou não ajustado; (ref.) – categoria de referência para o OR

Em relação ao número de divisões das habitações, observou-se que 21,4% (89/416) das crianças que viviam em casas com menos de quatro divisões estavam parasitadas e 19,7% (81/412) das que viviam em casas com quatro ou mais divisões também o estavam. Das 707 crianças que viviam em casa com menos de três pessoas por divisão 138 (19,5%) apresentavam infecção em comparação com 26,4% (32/121) das que viviam em casas com densidades iguais ou superiores a três (Tabela 3.23).

**Tabela 3.24** Exploração da associação entre a variável dependente infecção simples por *G. duodenalis* e a variável independente infecção por VIH.

	n	% (n)	IC95%	<i>p</i>	ORbruto	IC95% (ORb)
<b>VIH</b>	471					
Sim	221	23,1 (51)	(20,2; 26,0)	0,303	1,262	(0,810; 1,968)
Não	250	19,2 (48)	(16,5; 21,9)		ref	

n – número de respostas válidas (denominador); % (n) – percentagem e respetiva frequência absoluta das crianças com infecção simples por *G. duodenalis*; IC95% - intervalo de confiança a 95% da estimativa; *p* – refere-se à comparação da proporção entre as classes da variável; ORbruto – Odds Ratio bruto ou não ajustado; IC95% (ORb) – intervalo de confiança a 95% da estimativa do Odds Ratio bruto ou não ajustado; (ref.) – categoria de referência para o OR

O número de crianças co-infetadas pelo VIH e *G. duodenalis* (23,1%, 51/221) foi muito próximo do número de crianças sem infecção por este vírus mas parasitadas (19,2%, 48/250) (Tabela 3.24).

Nenhuma das associações testadas foi estatisticamente significativa.

### 3.6.1.3 Infecção pelo genótipo A de *G. Duodenalis*

Os resultados da exploração da associação da variável dependente “infecção pelo genótipo A” encontram-se apresentados nas Tabelas 3.25-3.27.

**Tabela 3.25** Exploração da associação entre a variável dependente infecção pelo genótipo A e as variáveis independentes, grupo etário, sexo das crianças, densidade de pessoas na habitação e infecção pelo VIH.

	n	% (n)	IC95%	p
<b>Grupo etário</b>	86			
< 24 meses	40	20,0 (8)	(17,3; 22,7)	
24-59 meses	46	13,0 (6)	(10,7; 15,3)	0,383
<b>Sexo</b>	86			
Feminino	32	12,5 (4)	(10,3; 14,7)	0,465
Masculino	54	18,5 (10)	(15,9; 21,1)	
<b>Densidade de pessoas na habitação</b>	86			
<3	67	19,4 (13)	(16,7; 22,1)	
≥3	19	5,3 (1)	(3,8; 6,8)	0,128 <sup>a</sup>
<b>VIH</b>	57			
Sim	31	22,6 (7)	(19,8; 25,4)	0,120 <sup>a</sup>
Não	26	7,7 (2)	(5,9; 9,5)	

n – número de respostas válidas (denominador); % (n) – percentagem e respetiva frequência absoluta das crianças com infecção pelo genótipo A de *G. duodenalis*; IC95% - intervalo de confiança a 95% da estimativa; p – refere-se à comparação da proporção entre as classes da variável; a - teste exato de Fisher.

O número de crianças infetadas pelo genótipo A foi superior para o caso das crianças com menos de 24 meses (20,0%, 8/40) e para as do sexo masculino (18,5%, 10/54) (Tabela 3.25).

Em relação à densidade de pessoas na habitação, onde se descreve que 19,4% (13/67) das crianças que viviam em casas com densidades inferiores a três pessoas estavam infetadas pelo genótipo A em oposição aos 5,3% (1/19) das que viviam em habitações com densidades iguais ou superiores a três (Tabela 3.25).

A percentagem de crianças com infecção pelo genótipo A e em simultâneo pelo VIH (22,6%, 7/31) foi superior às que tinham apenas infecção pelo VIH (7,7%, 2/26) (Tabela 3.25).

As associações exploradas para a variável dependente “infecção pelo genótipo A”, não revelaram a existência de nenhuma associação estatisticamente significativa para qualquer uma das variáveis independentes testadas (grupo etário, sexo, densidade de pessoas na habitação e infecção pelo VIH).

### 3.6.1.4 Infecção pelo genótipo B de *G. duodenalis*

Os resultados da exploração da associação da variável dependente “infecção pelo genótipo B” encontram-se apresentados na Tabela 3.26.

**Tabela 3.26** Exploração da associação entre a variável dependente infecção pelo genótipo B e as variáveis independentes, grupo etário, sexo das crianças, densidade de pessoas na habitação e infecção pelo VIH.

	n	% (n)	IC95%	p
<b>Grupo etário</b>	86			
< 24 meses	40	80,0 (32)	(77,3; 82,7)	
24-59 meses	46	87,0 (40)	(84,7; 89,3)	0,383
<b>Sexo</b>	86			
Feminino	32	87,5 (28)	(85,3; 89,7)	0,465
Masculino	54	81,5 (44)	(78,9; 84,1)	
<b>Densidade de pessoas na habitação</b>	86			
<3	67	80,6 (54)	(77,9; 83,3)	
≥3	19	94,7 (18)	(93,2; 96,2)	0,128 <sup>a</sup>
<b>VIH</b>	57			
Sim	31	77,4 (24)	(74,6; 80,2)	0,120 <sup>a</sup>
Não	26	92,3 (24)	(90,5; 94,1)	

n – número de respostas válidas (denominador); % (n) – percentagem e respetiva frequência absoluta das crianças com infecção pelo genótipo B de *G. duodenalis*; IC95% - intervalo de confiança a 95% da estimativa; p – refere-se à comparação da proporção entre as classes da variável; a - teste Exato de Fisher.

O número de crianças infetadas pelo genótipo B foi ligeiramente superior para o caso das crianças 24 meses de idade ou mais (87,0%, 40/46) e para o sexo feminino (87,5%, 28/32) (Tabela 3.26).

O valor da infecção pelo genótipo B para as crianças que viviam em casas com densidades inferiores a três pessoas foi de 80,6% (54/67) e de 94,7% (18/19) para as que viviam em habitações com densidades iguais ou superiores a três (Tabela 3.26).

Das 26 crianças sem infecção pelo VIH, 24 apresentavam infecção pelo genótipo B (92,3%) e 24 em 31 (77,4%) estavam co-infetadas pelo VIH e genótipo B (Tabela 3.26).

Tal como no caso da variável dependente “infecção pelo genótipo A”, não se verificou a existência de nenhuma associação estatisticamente significativa entre a

infecção pelo genótipo B e as variáveis independentes testadas (grupo etário, sexo, densidade de pessoas na habitação e infecção pelo VIH).

### 3.6.2 Desnutrição

Os resultados das associações entre as diferentes formas de desnutrição (baixo peso, desnutrição crónica e desnutrição aguda) e a infecção por *G. duodenalis* (total e simples) e pelos genótipos A e B como variáveis independentes encontram-se descritos na Tabela 3.27.

**Tabela 3.27** Exploração da associação entre as variáveis dependentes, baixo peso, desnutrição crónica e aguda, e as variáveis infecção total, simples e pelos genótipos A e B de *G. duodenalis*.

	n	% (n)	IC95%	p	ORbruto	IC95% (ORb)
Baixo peso						
Infeção total por <i>G. duodenalis</i>	747					
Não	567	83,2 (472)	(80,7; 85,7)		ref	
Sim	180	80,0 (144)	(77,3; 82,7)	0,319	0,805	(0,526; 1,233)
Infeção simples por <i>G. duodenalis</i>	747					
Não	591	83,4 (493)	(80,9; 85,9)		ref	
Sim	156	78,8 (123)	(76,0; 81,6)	0,183	0,741	(0,477; 1,152)
Infeção pelo genótipo	74					
A	12	75,0 (9)	(72,1; 77,9)	0,457 <sup>b</sup>		n.a.
B	62	80,6 (50)	(77,9; 83,3)			
Desnutrição crónica						
Infeção total por <i>G. duodenalis</i>	830					
Não	632	79,4 (502)	(76,6; 82,2)		ref	
Sim	198	77,8 (154)	(75,0; 80,6)	0,618	0,906	(0,616; 1,334)
Infeção simples por <i>G. duodenalis</i>	830					
Não	660	79,8 (527)	(76,5; 83,1)		ref	
Sim	170	75,9 (129)	(72,3; 79,5)	0,258	0,794	(0,533; 1,184)
Infeção pelo genótipo	86					

	n	% (n)	IC95%	p	ORbruto	IC95% (ORb)
A	14	100,0 (14)	(100,0;100,0)	0,185		
B	72	87,5 (63)	(85,3; 89,7)	<sup>b</sup>		n.a.
<b>Desnutrição aguda</b>						
<b>Infeção total por</b>						
<i>G. duodenalis</i>	830					
Não	632	73,4 (464)	(70,4; 76,4)		ref	
Sim	198	65,7 (130)	(62,5; 68,9)	<b>0,035</b>	0,692	(0,492; 0,975)
<b>Infeção simples por</b>						
<i>G. duodenalis</i>	830					
Não	660	73,8 (487)	(70,8; 76,8)		ref	
Sim	170	62,9 (107)	(59,6; 66,2)	<b>0,005</b>	0,603	(0,422; 0,862)
<b>Infeção pelo genótipo</b>						
	86					
A	14	57,1 (8)	(53,7; 60,5)			
B	72	63,9 (46)	(60,6; 67,2)	0,418 <sup>a</sup>		n.a.

n - número de respostas válidas (denominador); % (n) - percentagem e respetiva frequência absoluta das crianças desnutridas por baixo peso, desnutrição crónica e aguda, respetivamente; IC95% - intervalo de confiança a 95% da estimativa; p - refere-se à comparação da proporção entre as classes da variável; ORbruto – Odds Ratio bruto ou não ajustado; IC95% (ORb) – intervalo de confiança a 95% da estimativa do Odds Ratio bruto ou não ajustado; a - teste Qui-Quadrado de Pearson b - teste Exato de Fisher; n.a. – não aplicável.

Os valores de desnutrição por baixo peso e crónica foram semelhantes nas crianças sem e com infeção total e simples por *G. duodenalis*, bem como a infeção por qualquer um dos seus genótipos (A e B). Assim, verificou-se que 83,2% (472/567) e 83,4% (493/591) das crianças não parasitadas apresentavam baixo peso, enquanto 80,0% (144/180) e 78,8% (123/156) das parasitadas tinham este tipo de desnutrição (infeção total e simples por *G. duodenalis*, respetivamente). Deve ainda ser mencionado que com este estado nutricional, 75,0% (9/12) tinham infeção pelo genótipo A e 80,6% (50/62) pelo B (Tabela 3.27). No caso da desnutrição crónica, 79,4% (502/632) e 79,8% (527/660) das crianças com este estado nutricional não estavam parasitadas, enquanto 77,8% (154/198) e 75,9% (129/170) estavam parasitadas (infeção total e simples por *G. duodenalis*, respetivamente). Relativamente aos genótipos, 100,0% (14/14) tinha infeção pelo genótipo A e 87,5% (63/72) pelo B. Os resultados referentes à desnutrição aguda demonstraram diferenças entre as crianças infetadas e não infetadas, nas quais

65,7% (130/198) e 62,9% (107/170), apresentavam infecção total e simples, respectivamente, enquanto 73,4% (464/632) e 73,8% (487/660) não tinham infecção total nem simples, respectivamente. Estas diferenças entre a infecção total e simples por *G. duodenalis* e a desnutrição aguda foram estatisticamente significativas ( $p=0,035$  e  $p=0,005$ , respectivamente). Assim, as crianças que se encontravam infetadas por *G. duodenalis* (total ou simples) apresentavam uma menor probabilidade de terem desnutrição aguda (OR: 0,692; IC95% (OR): 0,492-0,975 para a infecção total e OR: 0,603; IC95% (OR): 0,422-0,862 para a simples). A infecção pelo genótipo A ocorreu em 57,1% (8/14) das crianças com desnutrição aguda e pelo B em 63,9% (46/72) (Tabela 3.27).

### 3.6.3 Sintomatologia

#### 3.6.3.1 Diarreia

Investigou-se a associação das variáveis dependentes relacionadas com a doença diarreica e as variáveis independentes infecção por *G. duodenalis* (total e simples) e a presença de infecção pelos genótipos A e B (Tabela 3.28).

**Tabela 3.28** Exploração entre as variáveis dependentes, diarreia, duração da diarreia (dias), número de dejeções por dia e apresentação de diarreia aquosa e as variáveis infecção total, simples e pelos genótipos A e B de *G. duodenalis*.

	n	% (n)	IC95%	<i>p</i>	ORbruto	IC95% (ORb)
<b>Diarreia</b>						
<b>Infeção total por <i>G. duodenalis</i></b>	831					
Não	633	57,5 (364)	(54,1; 60,9)		ref	
Sim	198	52,0 (103)	(48,6; 55,4)	0,175	0,801	(0,582; 1,104)
<b>Infeção simples por <i>G. duodenalis</i></b>	831					
Não	661	57,2 (378)	(53,8; 60,6)	0,258	ref	
Sim	170	52,4 (89)	(49,0; 55,8)		0,823	(0,587; 1,154)
<b>Infeção pelo genótipo</b>	86					
A	14	28,6 (4)	(25,5; 31,7)	0,620 <sup>a</sup>		n.a.
B	72	29,2 (21)	(26,1; 32,3)			



	n	% (n)	IC95%	p	ORbruto	IC95% (ORb)
Diarreia por 3 ou mais dias						
Infeção total por <i>G. duodenalis</i>	466					
Não	363	87,3 (317)	(85,0; 89,6)		ref	
Sim	103	83,5 (86)	(81,0; 86,0)	0,317	0,734	(0,401; 1,345)
Infeção simples por <i>G. duodenalis</i>	466					
Não	377	87,3 (329)	(84,5; 90,1)		ref	
Sim	89	83,1 (74)	(80,0; 86,2)	0,308	0,720	(0,382; 1,354)
Infeção pelo genótipo	25					
A	4	75,0 (3)	(72,1; 77,9)	0,693 <sup>a</sup>		n.a.
B	21	71,4 (15)	(68,3; 74,5)			
3 ou mais dejeções por dia						
Infeção total por <i>G. duodenalis</i>	462					
Não	360	79,7 (287)	(77,0; 82,4)		ref	
Sim	102	75,5 (77)	(72,6; 78,4)	0,411	0,805	(0,480; 1,351)
Infeção simples por <i>G. duodenalis</i>	462					
Não	374	79,1 (296)	(76,3; 81,9)		ref	
Sim	88	77,3 (68)	(74,5; 80,1)	0,766	0,919	(0,527; 1,603)
Infeção pelo genótipo	25					
A	4	25,0 (1)	(22,0; 28,0)	0,159 <sup>a</sup>		n.a.
B	21	66,7 (14)	(63,5; 69,9)			
Diarreia aquosa						
Infeção total por <i>G. duodenalis</i>	464					
Não	361	67,9 (245)	(64,7; 71,1)	0,986	ref	
Sim	103	68,0 (70)	(64,8; 71,2)		1,004	(0,628; 1,606)
Infeção simples por <i>G. duodenalis</i>	464					
Não	375	67,5 (253)	(64,3; 70,7)	0,690	ref	
Sim	89	69,7 (62)	(66,6; 72,8)		1,107	(0,671; 1,827)
Infeção pelo genótipo	25					

	n	% (n)	IC95%	p	ORbruto	IC95% (ORb)
A	4	25,0 (1)	(22,0; 28,0)	0,116 <sup>a</sup>		n.a.
B	21	66,7 (14)	(63,5; 69,9)			

n - número de respostas válidas (denominador); % (n) - percentagem e respetiva frequência absoluta das crianças com diarreia, com diarreia por 3 ou mais dias, com 3 ou mais dejeções por dia e apresentação de diarreia aquosa, respetivamente; IC95% - intervalo de confiança a 95% da estimativa; p - refere-se à comparação da proporção entre as classes da variável; ORbruto – Odds Ratio bruto ou não ajustado; IC95% (ORb) – intervalo de confiança a 95% da estimativa do Odds Ratio bruto ou não ajustado; a - teste Exato de Fisher; n.a. – não aplicável.

O número de crianças com diarreia foi idêntico, quer para as crianças parasitadas, quer para as não parasitadas (Tabela 3.28). Deste modo, para as variáveis “infecção total por *G. duodenalis*” e “infecção simples por *G. duodenalis*” 57,5 % (364/633) e 57,2% (378/661) das crianças não infetadas tinham diarreia, 87,3% (317/363) e 87,3% (329/377) relatavam ter diarreia durante três ou mais dias, 79,7% (287/360) e 79,1% (296/374) mencionavam ter três ou mais dejeções por dia e 67,9% (245/361) e 67,5% (253/375) a existência de diarreia aquosa. Por outro lado, das crianças infetadas 52,0 % (103/198) e 52,4% (89/170) tinham diarreia, 83,5% (86/103) e 83,1% (74/89) relatavam ter diarreia durante três ou mais dias, 75,5% (77/102) e 77,3% (68/88) mencionavam ter três ou mais dejeções por dia e 68,0% (70/103) e 69,7% (62/79) a existência de diarreia aquosa, para a infecção total e simples, respetivamente. Em relação aos genótipos também se obtiveram resultados semelhantes para ambos no que respeitou à diarreia (28,6%, 4/14 para o genótipo A e 29,2%, 21/72 para o B) e duração da diarreia (75,%, 3/4 para o genótipo A e 71,4%, 15/21 para o B). No entanto, para as variáveis dependentes “número de dejeções por dia” e “apresentação de diarreia aquosa” observou-se uma diferença para a infecção pelos genótipos (25,0%, 1/4 para o genótipo A e 66,7%, 14/21 para o B, respetivamente para cada variável citada). Apesar destas diferenças os resultados obtidos não revelaram nenhuma associação estatisticamente significativa (Tabela 3.28).

### 3.6.3.2 Outros sintomas

Explorou-se a associação entre outros sintomas sugestivos de infecção intestinal por parasitas, tendo como variáveis dependentes vômitos, febre, dor abdominal e falta

de apetite, e as variáveis independentes infecção por *G. duodenalis* (total e simples) e infecção pelos genótipos A e B (Tabela 3.29).

**Tabela 3.29** Exploração entre as variáveis dependentes, vômitos, febre, dor abdominal e falta de apetite e as variáveis infecção total, simples e pelos genótipos A e B de *G. duodenalis*.

	n	% (n)	IC95%	p	ORbruto	IC95% (ORb)
Vômitos						
Infeção total por <i>G. duodenalis</i>	831					
Não	633	75,8 (480)	(72,9; 78,7)		ref	
Sim	198	77,8 (154)	(75,0; 80,6)	0,574	0,896	(0,612; 1,312)
Infeção simples por <i>G. duodenalis</i>	831					
Não	661	23,9 (158)	(21,0; 26,8)		ref	
Sim	170	22,9 (39)	(20,0; 25,8)	0,793	0,948	(0,635; 1,414)
Infeção pelo genótipo	86					
A	14	7,1 (1)	(5,4; 8,8)	0,614 <sup>a</sup>		n.a.
B	72	9,7 (7)	(7,7; 11,7)			
Febre						
Infeção total por <i>G. duodenalis</i>	831					
Não	633	64,0 (405)	(60,7; 67,3)		ref	
Sim	198	68,7 (136)	(65,5; 71,9)	0,226	0,810	(0,576; 1,139)
Infeção simples por <i>G. duodenalis</i>	831					
Não	661	35,6 (235)	(31,6; 39,6)		ref	
Sim	170	32,4 (55)	(28,5; 36,3)	0,435	0,867	(0,606; 1,241)
Infeção pelo genótipo	86					
A	14	21,4 (3)	(18,6; 24,2)	0,538 <sup>a</sup>		n.a.
B	72	25,0 (18)	(22,1; 27,9)			
Dor abdominal						
Infeção total por <i>G. duodenalis</i>	831					
Não	633	60,1 (347)	(56,8; 63,4)		ref	
Sim	198	54,8 (119)	(51,4; 58,2)	0,192	0,805	(0,582; 1,114)

	n	% (n)	IC95%	p	ORbruto	IC95% (ORb)
<b>Infeção simples por <i>G. duodenalis</i></b>	831					
Não	661	44,6 (295)	(41,2; 48,0)		ref	
Sim	170	41,2 (70)	(37,9; 44,5)	0,419	0,868	(0,617; 1,222)
<b>Infeção pelo genótipo</b>	86					
A	14	28,6 (4)	(25,5; 31,7)	0,550 <sup>a</sup>		n.a.
B	72	26,4 (19)	(23,4; 29,4)			
<b>Falta de apetite</b>						
<b>Infeção total por <i>G. duodenalis</i></b>	831					
Não	633	47,6 (301)	(44,2; 51,0)		ref	
Sim	198	54,5 (108)	(51,1; 57,9)	0,086	0,756	(0,548; 1,041)
<b>Infeção simples por <i>G. duodenalis</i></b>	831					
Não	661	52,0 (344)	(48,6; 55,4)		ref	
Sim	170	45,9 (78)	(42,5; 49,3)	0,152	0,781	(0,557; 1,096)
<b>Infeção pelo genótipo</b>	86					
A	14	21,4 (3)	(18,6; 24,2)	0,408 <sup>a</sup>		n.a.
B	72	29,2 (21)	(26,1; 32,3)			

n - número de respostas válidas (denominador); % (n) - percentagem e respetiva frequência absoluta das crianças com queixas de vômitos, febre, dor abdominal e falta de apetite, respetivamente; IC95% - intervalo de confiança a 95% da estimativa; p - refere-se à comparação da proporção entre as classes da variável; ORbruto – Odds Ratio bruto ou não ajustado; IC95% (ORb) – intervalo de confiança a 95% da estimativa do Odds Ratio bruto ou não ajustado; a - teste Exato de Fisher; n.a. – não aplicável.

Das crianças que referiram o sintoma “vômitos” 77,8% (154/198), 22,9% (39/170), 7,1% (1/14) e 9,7% (7/72) tinham infeção total, simples, pelo genótipo A e B de *G. duodenalis*, de acordo com a ordem indicada. Por outro lado, as crianças sem infeção total e simples eram 77,8% (154/198) e 22,9% (39/170), respetivamente. As crianças com febre e parasitadas correspondiam a 68,7% (136/198), 32,4% (55/170), 21,4% (3/14) e 25,0% (18/72), para a infeção total, simples e pelos genótipos A e B, respetivamente. Por sua vez, 64,0% (405/633) das crianças com febre não tinham infeção total por *G. duodenalis* e 35,6% (235/661) não apresentavam infeção simples. A dor abdominal foi descrita em 54,8% (119/198), 41,2% (70/170), 28,6% (4/14) e 26,4

(19/72) das crianças com infecção total, simples e pelos genótipos A e B, conforme a ordem indicada, enquanto 60,1% (347/633) não tinham infecção total e 44,6% (295/661) simples. A falta de apetite foi referida por 54,5% (108/198), 45,9% (78/170), 21,4% (3/14) e 29,2% (21/72) crianças com infecção total, simples e pelos genótipos A e B, respetivamente. Para as crianças com este sintoma e sem infecção, total e simples, os resultados foram de 47,6% (301/633) e de 52,0% (344/661), respetivamente. Não se observou nenhuma associação estatisticamente significativa para qualquer uma das variáveis descritas anteriormente (Tabela 3.29).

### 3.7 Modelos de regressão multivariada

Os modelos de regressão multivariada foram realizados para todas as variáveis dependentes nas quais se verificou um valor de  $p$  inferior a 20% ( $p < 0,200$ ), juntamente com as variáveis grupo etário e sexo consideradas como fatores de confundimento. Assim sendo, foram testados os seguintes modelos:

- a) Infecção total por *G. duodenalis* Vs aleitamento materno e densidade de pessoas na habitação.
- b) Infecção simples por *G. duodenalis* Vs aleitamento materno e densidade de pessoas na habitação.
- c) Desnutrição por baixo peso Vs infecção simples por *G. duodenalis*.
- d) Desnutrição aguda Vs infecção total e simples por *G. duodenalis*.
- e) Diarreia Vs infecção total por *G. duodenalis*.
- f) Sintoma dor abdominal Vs infecção total por *G. duodenalis*.
- g) Sintoma falta de apetite Vs infecção total e simples por *G. duodenalis*.

Todos os modelos elaborados apresentaram um bom ajustamento de acordo com os valores de  $p$  obtidos pelo teste de Hosmer e Lemeshow ( $p > 0,05$ ).

Para o modelo relativo à infecção total por *G. duodenalis* observou-se que ajustando para as variáveis grupo etário, sexo, aleitamento materno e densidade de pessoas na habitação, em simultâneo, apenas a densidade de pessoas na habitação se revelou estatisticamente significativa ( $p = 0,034$ ). O valor de OR ajustado (1,596) aumentou ligeiramente em relação ao seu valor bruto (1,565) (Tabela 3.30).

**Tabela 3.30** Modelo de regressão multivariada para a infecção total por *G. duodenalis*, tendo como variáveis independentes o grupo etário, sexo, aleitamento materno e densidade de pessoas na habitação.

	n	OR Ajustado	IC95% (ORa)	p	Avaliação do modelo
					$p^{\text{HL}}$
					0,895
<b>Grupo etário</b>	801				
< 24 meses	593	ref			
24-59 meses	208	1,258	(0,823; 1,924)	0,288	
<b>Sexo</b>	801				
Feminino	360	0,944	(0,679; 1,313)	0,731	
Masculino	441	ref			
<b>Aleitamento materno</b>	801				
Sem aleitamento	418	3,210	(0,727; 14,173)	0,124	
Não exclusivo	360	2,921	(0,669; 12,747)	0,154	
Exclusivo	23	ref			
<b>Densidade de pessoas na habitação</b>	801				
<3	686	ref			
≥3	115	1,596	(1,035; 2,461)	<b>0,034</b>	

n - número de respostas válidas (denominador); OR Ajustado - Odds Ratio ajustado para as variáveis de confundimento: grupo etário (meses), sexo, aleitamento materno e densidade de pessoas na habitação; IC95% (ORa) - intervalo de confiança a 95% da estimativa do Odds Ratio ajustado; p - p refere-se ao teste de significância do parâmetro de cada um dos níveis em cada fator ( $H_0$ :OR=1, hipótese de não associação);  $p^{\text{HL}}$  - p refere-se ao nível de significância do teste de Hosmer e Lemeshow acerca do bom ajustamento do modelo; (ref.) - categoria de referência para o OR

Para o modelo relativo à infecção simples por *G. duodenalis* observou-se que ajustando para as variáveis grupo etário, sexo, aleitamento materno e densidade de pessoas na habitação, em simultâneo, apenas a densidade de pessoas na habitação se revelou estatisticamente significativa ( $p=0,048$ ). Tal não se tinha verificado no estudo de associação anterior (secção 3.6.1.2, Tabela 3.23). O valor de OR ajustado (1,580) aumentou em relação ao seu valor bruto (1,482) (Tabela 3.31).

**Tabela 3.31** Modelo de regressão multivariada para a infecção simples por *G. duodenalis*, tendo como variáveis independentes o grupo etário, sexo e o aleitamento materno e densidade de pessoas na habitação.

	n	OR Ajustado	IC95% (ORa)	p	Avaliação do modelo
					$p^{\text{HL}}$
					0,899
<b>Grupo etário</b>	801				
< 24 meses	593	ref			
24-59 meses	208	1,386	(0,882; 2,177)	0,157	
<b>Sexo</b>	801				
Feminino	360	0,918	(0,649; 1,300)	0,631	
Masculino	441	ref			
<b>Aleitamento materno</b>	801				
Sem aleitamento	418	2,368	(0,533; 10,516)	0,257	
Não exclusivo	360	2,587	(0,592; 11,309)	0,207	
Exclusivo	23	ref			
<b>Densidade de pessoas na habitação</b>	801				
<3	686	ref			
≥3	115	1,580	(1,005; 2,483)	<b>0,048</b>	

n - número de respostas válidas (denominador); OR Ajustado - Odds Ratio ajustado para as variáveis de confundimento: grupo etário (meses), sexo, aleitamento materno e densidade de pessoas na habitação; IC95% (ORa) - intervalo de confiança a 95% da estimativa do Odds Ratio ajustado; p - p refere-se ao teste de significância do parâmetro de cada um dos níveis em cada fator (H0:OR=1, hipótese de não associação);  $p^{\text{HL}}$  - p refere-se ao nível de significância do teste de Hosmer e Lemeshow acerca do bom ajustamento do modelo; (ref.) - categoria de referência para o OR

Em relação ao modelo sobre a desnutrição por baixo peso constatou-se que ajustando para as variáveis grupo etário, sexo e infecção simples por *G. duodenalis*, apenas a variável grupo etário foi estatisticamente significativa ( $p=0,001$ ), com um valor de OR ajustado de 0,514. Este resultado indica que todas crianças entre os 24 e os 59 meses tinham uma menor probabilidade de estarem desnutridas por baixo peso (Tabela 3.32).

**Tabela 3.32** Modelo de regressão multivariada para a desnutrição por baixo peso, tendo como variáveis independentes o grupo etário, sexo e infecção simples por *G. duodenalis*.

		Avaliação do modelo		
	n	OR Ajustado	IC95% (ORa)	<i>p</i>
		<i>P</i> <sup>HL</sup>		
		0,886		
<b>Grupo etário</b>	747			
< 24 meses	545	ref		
24-59 meses	202	0,514	(0,345; 0,765)	<b>0,001</b>
<b>Sexo</b>	747			
Feminino	338	1,201	(0,816; 1,767)	0,352
Masculino	409	ref		
<b>Infeção simples por <i>G. duodenalis</i></b>	747			
Não	591	ref		
Sim	156	0,768	(0,492; 1,200)	0,246

n - número de respostas válidas (denominador); OR Ajustado - Odds Ratio ajustado para as variáveis de confundimento: grupo etário (meses), sexo e infecção simples por *G. duodenalis*; IC95% (ORa) - intervalo de confiança a 95% da estimativa do Odds Ratio ajustado; *p* - *p* refere-se ao teste de significância do parâmetro de cada um dos níveis em cada fator ( $H_0$ :OR=1, hipótese de não associação); *p*<sup>HL</sup> - *p* refere-se ao nível de significância do teste de Hosmer e Lemeshow acerca do bom ajustamento do modelo; (ref.) - categoria de referência para o OR

O modelo sobre a desnutrição aguda para o qual se ajustaram simultaneamente as variáveis grupo etário, sexo e infecção total e simples por *G. duodenalis*, demonstrou ser estatisticamente significativo para a variável grupo etário ( $p=0,000$ ) e para a variável infecção simples por *G. duodenalis* ( $p=0,041$ ). Deste modo, conclui-se que as crianças entre os 24 e os 59 meses de idade tinham uma menor probabilidade de apresentarem desnutrição aguda, e confirmou-se o resultado obtido para a associação testada anteriormente, mas apenas para a infecção simples (secção 3.6.2, Tabela 3.27). O valor de OR ajustado (0,340) diminuiu em relação ao seu valor bruto (0,603) (Tabela 3.33).



**Tabela 3.33** Modelo de regressão multivariada para a desnutrição aguda, tendo como variáveis independentes o grupo etário, sexo e infecção total e simples por *G. duodenalis*.

					Avaliação do modelo
	n	OR Ajustado	IC95% (ORa)	p	P <sup>HL</sup>
					0,939
Grupo etário	831				
< 24 meses	600	ref			
24-59 meses	231	0,405	(0,292; 0,561)	<b>0,000</b>	
Sexo	831				
Feminino	371	0,903	(0,661; 1,232)	0,519	
Masculino	460	ref			
Infeção total por <i>G. duodenalis</i>	830				
Não	632	ref			
Sim	198	1,842	(0,679; 5,001)	0,231	
Infeção simples por <i>G. duodenalis</i>	830				
Não	660	ref			
Sim	170	0,340	(0,121; 0,956)	<b>0,041</b>	

n - número de respostas válidas (denominador); OR Ajustado - Odds Ratio ajustado para as variáveis de confundimento: grupo etário (meses), sexo, infecção total e simples por *G. duodenalis*; IC95% (ORa) - intervalo de confiança a 95% da estimativa do Odds Ratio ajustado; p - p refere-se ao teste de significância do parâmetro de cada um dos níveis em cada fator ( $H_0: OR=1$ , hipótese de não associação);  $p^{HL}$  - p refere-se ao nível de significância do teste de Hosmer e Lemeshow acerca do bom ajustamento do modelo; (ref.) - categoria de referência para o OR

Para o modelo sobre a diarreia observou-se que ajustando para as variáveis grupo etário, sexo e infecção total por *G. duodenalis*, apenas a variável grupo etário se revelou estatisticamente significativa ( $p=0,000$ ), com um valor de *Odds Ratio* ajustado de 0,326. Este resultado indica que as crianças entre os 24 e os 59 meses tinham uma menor probabilidade de terem diarreia (Tabela 3.34).

**Tabela 3.34** Modelo de regressão multivariada para a diarreia, tendo como variáveis independentes o grupo etário, sexo e a infecção total por *G. duodenalis*.

	n	OR Ajustado	IC95% (ORa)	p	Avaliação do modelo
					$p^{HL}$
					0,231
<b>Grupo etário</b>	831				
< 24 meses	600	ref			
24-59 meses	231	0,326	(0,238; 0,448)	<b>0,000</b>	
<b>Sexo</b>	831				
Feminino	371	1,115	(0,838; 1,482)	0,456	
Masculino	460	ref			
<b>Infeção total por <i>G. duodenalis</i></b>	831				
Não	633	ref			
Sim	198	0,844	(0,606; 1,175)	0,315	

n - número de respostas válidas (denominador); OR Ajustado - Odds Ratio ajustado para as variáveis de confundimento: grupo etário (meses), sexo e infecção total por *G. duodenalis*; IC95% (ORa) - intervalo de confiança a 95% da estimativa do Odds Ratio ajustado; p - p refere-se ao teste de significância do parâmetro de cada um dos níveis em cada fator ( $H_0$ :OR=1, hipótese de não associação);  $p^{HL}$  - p refere-se ao nível de significância do teste de Hosmer e Lemeshow acerca do bom ajustamento do modelo; (ref.) - categoria de referência para o OR

Em relação ao modelo sobre a dor abdominal constatou-se que ajustando para as variáveis grupo etário, sexo e infecção total por *G. duodenalis*, apenas a variável grupo etário se revelou estatisticamente significativa ( $p=0,000$ ), com um valor de *Odds Ratio* ajustado de 0,505. Este resultado indica que as crianças entre os 24 e os 59 meses de idade tinham uma menor probabilidade de apresentarem queixas de dor abdominal (Tabela 3.35).

**Tabela 3.35** Modelo de regressão multivariada para o sintoma dor abdominal, tendo como variáveis independentes o grupo etário, sexo e a infecção total por *G. duodenalis*.

					Avaliação do modelo
	n	OR Ajustado	IC95% (ORa)	p	$P^{HL}$
					0,658
Grupo etário	831				
< 24 meses	600	ref			
24-59 meses	231	0,505	(0,366; 0,695)	0,000	
Sexo	831				
Feminino	371	1,023	(0,774; 1,352)	0,872	
Masculino	460	ref			
Infeção total por <i>G. duodenalis</i>	831				
Não	633	ref			
Sim	198	0,831	(0,598; 1,155)	0,271	

n - número de respostas válidas (denominador); OR Ajustado - Odds Ratio ajustado para as variáveis de confundimento: grupo etário (meses), sexo e infecção simples por *G. duodenalis*; IC95% (ORa) - intervalo de confiança a 95% da estimativa do Odds Ratio ajustado; p - p refere-se ao teste de significância do parâmetro de cada um dos níveis em cada fator (H0:OR=1, hipótese de não associação);  $p^{HL}$  - p refere-se ao nível de significância do teste de Hosmer e Lemeshow acerca do bom ajustamento do modelo; (ref.) - categoria de referência para o OR

Em relação ao modelo sobre a falta de apetite verificou-se que ajustando para as variáveis grupo etário, sexo e infecção total e simples por *G. duodenalis*, apenas a variável grupo etário se revelou estatisticamente significativa ( $p=0,000$ ), com um valor de *Odds Ratio* ajustado de 0,574. Este resultado indica que as crianças entre os 24 e os 59 meses tinham uma menor probabilidade de apresentarem queixas de falta de apetite (Tabela 3.36).

**Tabela 3.36** Modelo de regressão multivariada para o sintoma falta de apetite, tendo como variáveis independentes o grupo etário, sexo, e infecção total e simples por *G. duodenalis*.

				Avaliação do modelo	
	n	OR Ajustado	IC95% (ORa)	p	<i>P</i> <sup>HL</sup>
					0,401
<b>Grupo etário</b>	831				
< 24 meses	600	ref			
24-59 meses	231	0,574	(0,422; 0,782)	<b>0,000</b>	
<b>Sexo</b>	831				
Feminino	371	0,936	(0,710; 1,234)	0,638	
Masculino	460	ref			
<b>Infeção total por <i>G. duodenalis</i></b>	831				
Não	633	ref			
Sim	198	0,710	(0,328; 1,535)	0,384	
<b>Infeção total por <i>G. duodenalis</i></b>	781				
Não	661	ref			
Sim	170	1,317	(0,489; 2,488)	0,813	

n - número de respostas válidas (denominador); OR Ajustado - Odds Ratio ajustado para as variáveis de confundimento: grupo etário (meses), sexo e infecção total e simples por *G. duodenalis*; IC95% (ORa) - intervalo de confiança a 95% da estimativa do Odds Ratio ajustado; *p* - *p* refere-se ao teste de significância do parâmetro de cada um dos níveis em cada fator (H0:OR=1, hipótese de não associação); *p*<sup>HL</sup> - *p* refere-se ao nível de significância do teste de Hosmer and Lemeshow acerca do bom ajustamento do modelo; (ref.) - categoria de referência para o OR.

## ***4 Discussão e Conclusões***



Com o presente trabalho pretendeu-se investigar a existência de associação entre a infecção por *G. duodenalis*, bem como a infecção pelos respetivos genótipos, com o estado nutricional, diarreia e infecção pelo VIH em crianças com menos de cinco anos de idade no HCN, em Moçambique.

Os estudos publicados até hoje não têm demonstrado que a idade e o género das crianças são decididamente fatores de risco para a infecção por *Giardia* (146). Contudo, algumas publicações referem a existência de uma associação positiva entre o género feminino em idade adulta, que poderá ser explicado pelo exercício de atividades de cuidados a crianças em comunidades onde a prevalência de infecção por este microrganismo é maior neste grupo populacional (8,147,148). Outros autores consideram ainda a idade como um fator de risco importante para esta infecção, devido à observação de elevadas prevalências em jovens adultos e crianças (8,147,149–154). Estes grupos etários parecem ser mais susceptíveis pelos hábitos e práticas de higiene pessoal inadequadas ou à ausência de imunidade adquirida que lhes são geralmente associados (8,151). Apesar dos resultados do presente estudo não demonstrarem a existência de uma associação entre a idade e o género relativamente à presença de infecção por *G. duodenalis*, verificou-se que 39,8% (92/231) das crianças com mais de 24 meses de idade tinham infecção total por este protozoário, comparando com as 28,3% (170/600) com menos de 24 meses. Esta situação poderá ser eventualmente devida à presença de outros parasitas intestinais, nomeadamente de geohelmintas que parecem ser mais comuns em crianças mais velhas, cujo contato com o solo é maior. Mandomando e colaboradores (155) demonstraram que *A. lumbricoides* e *S. stercoralis* foram isolados em crianças mais velhas e estes helmintas foram também os mais frequentes no presente trabalho.

O nível de escolaridade dos pais, mais especificamente da mãe, tem sido considerado e comprovado pelos investigadores como um fator de risco potencial para a transmissão de parasitas intestinais (45,146,147,156). Neste trabalho a percentagem de pais sem escolaridade era reduzida (13,9%, 82/588) e a maioria estava a frequentar ou tinha frequentado o ensino secundário (60%, 353/588). No caso da escolaridade das mães, cerca de um quinto (21,7%, 168/774) não tinha escolaridade e apenas 36,6% (283/774) estava a frequentar ou tinha frequentado o ensino secundário. Durante o decorrer do estudo foi notado que pais ou mães com o ensino primário completo ou

mesmo com um ano completo de ensino secundário tinham dificuldades de escrita e/ou leitura. Provavelmente, esta situação poderá refletir a precariedade do ensino em Nampula e contribuir para a ignorância das práticas de higiene corretas que previnem as infecções por parasitas intestinais. Para a população estudada não foi encontrada nenhuma diferença estatisticamente significativa relativa a este fator de risco, assim como estudos conduzidos no Brasil (157), Malásia (8) e Yémen (158).

Outros fatores de risco habitualmente considerados para a aquisição de infecção por *G. duodenalis*, e contemplados no presente trabalho, relacionam-se com a fonte de água de consumo e respetivo tratamento, bem como com as condições de saneamento, gestão do lixo doméstico e características habitacionais. A maioria das crianças incluídas no estudo vivia em agregados familiares cujos hábitos favoreciam a proteção contra a infecção por parasitas intestinais: geralmente consumiam água canalizada (61,8%, 507/820) e cerca de metade bebia água tratada (49,5%, 376/760). A utilização de latrinas melhoradas ou de fossa aberta eram as situações mais comuns (44,2%, 364/824 e 41,3, 340/824, respetivamente) e os resíduos sólidos urbanos eram depositados longe de casa, na sua maioria num contentor para esse propósito (47,1%, 391/831). No que se referia à densidade de pessoas na habitação, apenas uma minoria das crianças viviam em habitações cuja densidade era igual ou superior a três pessoas por divisão (14,6%, 121/828). Não obstante, e em relação a todos os fatores mencionados para a população estudada, confirmou-se a existência de uma relação estatisticamente significativa entre a densidade de pessoas na habitação (número de pessoas por divisão da habitação) e a infecção total e simples por *G. duodenalis* ( $p=0,034$  e  $p=0,048$ , respetivamente), na qual existia um risco superior de infecção para as densidades iguais ou superiores a três pessoas. Esta situação era de esperar, estando bem determinado que uma das vias de transmissão de *Giardia* ocorre pessoa-a-pessoa, nomeadamente entre membros familiares e indivíduos que vivem em condições de aglomeração, uma vez que o inóculo necessário para o estabelecimento da infecção é reduzido (6,31,159).

Alguns autores defendem que o aleitamento materno tem um papel protector contra a infecção por este protozoário (121,160). Cerca de metade das crianças recebia aleitamento materno (47,8%, 384/804), mas apenas uma pequena percentagem tinha aleitamento materno exclusivo (2,9%, 23/804) no momento do estudo. Das 23 crianças



com aleitamento materno exclusivo no momento do estudo, apenas duas estavam infetadas por *G. duodenalis* (8,7%). Não entanto, não se verificou nenhuma associação estatisticamente significativa, o que poderá dever-se ao reduzido número de crianças com aleitamento exclusivo, como sugerido por Moyo *et al* (161), que obteve resultados semelhantes.

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, a desnutrição em crianças com menos de cinco anos de idade continua a ser um grave problema de saúde na província de Nampula. Mais de 70% das crianças incluídas nesta pesquisa encontrava-se desnutrida quando se considera o total dos tipos de desnutrição analisados. Embora os dados publicados relativos à desnutrição em crianças hospitalizadas sejam raros, um estudo conduzido em 2011 no HCN revelou a existência de uma prevalência de 49,2% (93/189) de crianças com menos de 59 meses de idade com desnutrição aguda grave (18). Outros dados disponíveis sobre a desnutrição na província de Nampula, mas relativos a crianças em contexto comunitário, provêm do Secretariado Técnico de Segurança Alimentar e Nutricional (SETSAN) (16) de Moçambique, que documenta que 63,1% das crianças com menos de cinco anos apresentava desnutrição crónica (comprimento/estatura-idade) em 2006. Para a desnutrição aguda (peso-comprimento/estatura) o SETSAN relatou que apenas afetava 2,6% das crianças com menos de cinco anos de idade. Há que considerar que os estudos de base hospitalar, incluíam crianças internadas na Enfermaria da Malnutrição e/ou crianças da Consulta externa da Malnutrição seria de esperar que os valores para a desnutrição fossem mais elevados. A diferença observada para a desnutrição aguda e anteriormente mencionada poderá dever-se ao facto deste estado nutricional implicar uma perda de peso recente que é mais evidente em crianças pequenas (162). Por outro lado, a desnutrição crónica que implica uma redução da taxa de crescimento linear nem sempre é imediatamente percebida (109). Poder-se-á ainda considerar que como mais de 70% (600/831) das crianças tinham menos de 24 meses, uma variação súbita de peso seria mais evidente, contribuindo para o número elevado de crianças com desnutrição aguda e baixo peso observadas neste trabalho (71,6%, 594/830 e 82,5%, 616/747, respetivamente). Do mesmo modo, isto poderá explicar a associação estatisticamente significativa que o modelo de regressão multivariada revelou, não só para a desnutrição aguda como para o baixo peso em relação ao grupo etário. Neste modelo, as crianças entre os 24 e os 59

meses de idade tinham uma menor probabilidade de apresentarem qualquer um destes estados nutricionais, uma vez que as variações de peso neste grupo etário são menos significativas ( $p=0,000$ ; OR Ajustado: 0,405; IC95% (ORa): 0,292-0,561 e  $p=0,001$ ; OR Ajustado: 0,514; IC95% (ORa): 0,345-0,765, respetivamente).

A maioria dos estudos que relacionam o estado nutricional com a infeção por *Giardia* tem sido conduzida a nível da comunidade. Além disso, as associações mais comumente descritas referem-se à desnutrição crónica, por incluírem crianças em idade escolar. No entanto, os resultados obtidos neste estudo revelaram apenas uma associação estatisticamente significativa entre a desnutrição aguda e a infeção simples por *G. duodenalis* ( $p=0,041$ ), na qual as crianças infetadas apresentavam uma menor probabilidade de terem desnutrição aguda (OR Ajustado: 0,340; IC95% (ORa): 0,121-0,956).

Uma publicação de 1989 (163), na qual os autores estudaram a giardíase assintomática em crianças com idades entre os três meses e três anos, frequentadoras de um centro de dia em Israel, descreveu que as crianças infetadas com *G. duodenalis* tinham tendência para ganhar mais peso e comprimento/estatura que as crianças sem infeção. No entanto, os autores apresentaram este resultado apenas como um facto, não se referindo a qualquer tipo de desnutrição e sublinhando que as crianças infetadas assintomáticas não apresentam qualquer desvantagem em termos de crescimento.

Não parece lógico que a infeção por *G. duodenalis* confira algum tipo de proteção relativamente ao estado nutricional da criança. Contudo, pode-se especular que talvez este parasita não encontre as condições necessárias para o seu desenvolvimento numa criança com desnutrição aguda. Na realidade, uma das consequências da desnutrição aguda é a baixa produção de ácido a nível do estômago (164), e está estabelecido que os sucos gástricos são necessários para o processo de desenquistamento de *G. duodenalis* (29,165). Como consequência, o seu ciclo de vida poderá ficar interrompido, não se detetando quistos e/ou trofozoítos nas fezes destas crianças, o que pode justificar a existência de um número maior de crianças infetadas eutróficas.

Apesar de mais de metade das crianças apresentarem diarreia (56,2%, 467/831), não foi encontrada nenhuma associação estatisticamente significativa com a infeção por *Giardia*. Do mesmo modo não se encontrou nenhuma associação para a sua duração,

número de dejeções e presença de diarreia aquosa. No entanto, na análise multivariada constatou-se que as crianças com idades iguais ou superiores a 24 meses tinham menor probabilidade de terem diarreia (OR Ajustado: 0,326; IC95% (ORa): 0,238-0,448) e este resultado foi estatisticamente significativo ( $p=0,000$ ). Atualmente sabe-se que a etiologia da diarreia é muito variada, podendo envolver bactérias e vírus (particularmente o rotavírus), para além de parasitas, o que pode justificar a existência de tantas crianças com diarreia mas sem uma relação aparente com a infeção por *Giardia*. Num estudo prospetivo de caso-controlo, em crianças dos 0 aos 59 meses de idades, realizado em vários países, incluindo Moçambique, *G. duodenalis* não foi identificada como um dos agentes patogénicos responsáveis por causar diarreia. Os principais agentes etiológicos identificados foram antes o rotavírus, *Cryptosporidium*, *Shigella* e *Escherichia coli* enterotoxigénica (166). Outro estudo sobre a etiologia da doença diarreica e conduzido num hospital rural no sul de Moçambique, em crianças com menos de 5 anos de idade, relatou *E. coli* como o patogénico mais comum, seguido do helminto *A. lumbricoides* (155). Para além disso, um grupo de investigadores na Tanzânia verificou que as crianças com seis meses de idade ou menos e hospitalizadas tinham diarreia de causa bacteriana e as que tinham idades compreendidas entre os sete e os 12 meses de causa viral (161). Contudo, um estudo mais recente realizado no Hospital Central de Maputo (Moçambique), numa população semelhante à do estudo referido anteriormente, identificou *G. duodenalis* (6,5%) e *T. trichiuria* (6,5%) como os parasitas responsáveis pela maioria das infeções observadas, apesar de não ter realizado nenhum estudo de associação para a presença de diarreia (167).

O número de episódios de diarreia anuais por criança em países de baixo e médio rendimento exibe os valores máximos em crianças entre os seis e os 12 meses de idade (168) e a diarreia é muitas vezes associada com estados de desnutrição, devido a alterações morfológicas na mucosa intestinal (169). Um estudo de revisão sistematizada e meta-análise sobre a associação entre *Giardia* e a diarreia pediátrica em países de baixo e médio rendimento concluiu que as crianças destes países experienciam uma inocuidade ou um efeito protetor da *Giardia* contra a diarreia aguda quando infetados por este protozoário. Estes autores apontam como possível explicação a idade inicial de exposição e a frequência de reexposições subsequentes, uma vez que nestes países a infeção ocorre nas primeiras semanas de vida. Nestas condições, as infeções iniciais por

*G. duodenalis* podem resultar em diarreia, mas a imunidade é rapidamente adquirida, conferindo protecção contra a doença sintomática em exposições subsequentes (159). Outro aspeto a considerar prende-se com o estado nutricional do hospedeiro. A interação entre o sistema imunitário e o intestino constitui muito provavelmente a chave para o desenvolvimento da desnutrição. A diarreia agrava a desnutrição, que por sua vez contribui para o aumento do número e duração dos episódios de diarreia (169). Estes dados, juntamente com o facto das crianças estudadas com menos de 24 meses de idade estarem mais suscetíveis à desnutrição aguda ( $p=0,000$ ), contribuem para explicar a associação observada entre a presença de diarreia e o grupo etário.

Quando se explorou a associação entre outros sintomas sugestivos de infeção por *G. duodenalis*, para todas as crianças estudadas, os resultados não revelaram nenhum significado estatístico. Porém, a análise de regressão multivariada efetuada para os sintomas dor abdominal e falta de apetite mostrou que as crianças mais velhas (24-59 meses de idade) tinham uma menor probabilidade de apresentarem queixas para estes sintomas ( $p=0,000$ ; OR Ajustado: 0,505; IC95% (ORa): 0,366-0,695 e  $p=0,000$ ; OR Ajustado: 0,574; IC95% (ORa): 0,422-0,782). Provavelmente a dor abdominal poderá ter sido mal interpretada pelas mães ou acompanhantes, uma vez que as crianças mais pequenas não têm a possibilidade de se expressarem, o choro ou desconforto observado poderia ter outra causa diferente. A diarreia pode conduzir à perda de apetite (114), e o facto das crianças com idades iguais ou superiores a 24 meses terem menor probabilidade de apresentarem diarreia, como descrito anteriormente, poderá ajudar a corroborar o resultado obtido para a diminuição de apetite.

Os resultados da análise parasitológica (microscopia e TDR) revelaram que *G. duodenalis* foi o parasita mais frequente, com uma prevalência de 23,9% (199/831). Este valor de prevalência encontra-se dentro do descrito para os países em vias de desenvolvimento (18,29,170). Mesmo considerando apenas os resultados da microscopia, *G. duodenalis* continua a ser o parasita mais frequente com uma frequência de 13,1% (109/831), seguido por *S. stercoralis* (4,1%, 34/831). Outra questão a considerar é que *Cryptosporidium* sp foi o terceiro parasita mais comum (3,4%, 28/831) identificado pela microscopia. Os resultados obtidos indicam que estes protozoários intestinais são agentes etiológicos importantes, sendo também frequentemente associados com distúrbios nutricionais pelo que deveriam receber mais

atenção a nível do seu diagnóstico (26). Uma limitação associada ao diagnóstico destes microrganismos deve-se ao facto de se ter obtido apenas uma amostra de fezes por criança. Esta limitação afeta particularmente o diagnóstico de *G. duodenalis*, uma vez que este parasita é eliminado de forma intermitente com as fezes. A colheita de três amostras de fezes aumentaria a sensibilidade do diagnóstico microscópico de 60-80% para mais de 90% (37).

A diferença observada entre o número de amostras com identificação positiva de *G. duodenalis* pela microscopia e pelo TDR foi muito discrepante. Este microrganismo foi identificado através desta técnica em 90 amostras, nas quais não foi visualizado na microscopia. Esta diferença poderá relacionar-se com o facto da maioria das amostras de fezes analisadas ser diarreica. Os trofozoítos são a forma mais comum em situações de fezes líquidas ou aquosas (171) e estes degradam-se com facilidade no ambiente externo por não corresponderem à forma resistente (quisto). Assim, através da microscopia há maior dificuldade em detetar os trofozítos que, poderão não manter uma estrutura intacta. Mas, uma vez o antigénio presente nas fezes é detetado pelo TDR. Já o contrário As amostras, ou seja, amostras que tiveram uma identificação positiva pela microscopia e não pelo TDR constituem uma minoria (14). As sensibilidades dos TDR utilizados eram de 100% e 97% (RIDA®QUICK Giardia e CERTEST Giardia, respetivamente), de acordo com os dados fornecidos pelo fabricante. A técnica de PCR, que em teoria seria a mais sensível, não amplificou DNA de *G. duodenalis* em 83 amostras positivas em que este microrganismo foi identificado pela microscopia ou TDR ou ambos. Este resultado poderá dever-se muito provavelmente ao método de extração de DNA aplicado. Este foi realizado a partir de fezes conservadas em papel de filtro e utilizando uma adaptação de um protocolo de extração de DNA a partir de amostras de sangue. Como para a extração se utilizam apenas 3 *spots* de (3mm aproximadamente para cada *spot*) poderá ter acontecido pela ausência de trofozoítos nos *spots* utilizados ou por ineficiência na remoção de inibidores da *Taq* polimerase durante o procedimento de extração de DNA.

Na população estudada, o genótipo B foi claramente predominante (82,8%, 72/87). Um estudo de revisão concluiu que este genótipo também foi o mais prevalente em diversos trabalhos (12). A distribuição mundial dos genótipos de *Giardia* que afetam o homem é muito variada e a sua predominância varia entre os diferentes países, como

referido na introdução (secção 1.3.7). Contudo, de uma forma geral o genótipo B parece ser o grupo genético mais comum (85).

No presente estudo, optou-se pela utilização de *primers* específicos para o fragmento do gene *bg*, para a determinação dos genótipo e subgenótipos. As giardinas formam uma família de proteínas estruturais (172) e a vantagem da utilização dos genes de giardinas como alvos para a detecção molecular de *Giardia* reside no facto de serem únicos e específicos deste parasita (173). Adicionalmente, a grande variabilidade observada para os genes *gdh* e *tpi* reflete-se em excessivas alterações nucleotídicas nas regiões de ligação dos *primers* o que pode resultar numa diminuição da sensibilidade da técnica de PCR (31). A utilização de um único gene para a análise genotípica de *G. duodenalis* foi limitante, sobretudo no que respeita à determinação de subgenótipos dentro do genótipo B. A dificuldade na determinação de subgenótipos B tem sido descrita na literatura e relaciona-se com o elevado grau de polimorfismo observado para estas sequências, independentemente da utilização de um único gene ou de vários (6,74). Este grau de polimorfismo foi observado não só para as posições nucleotídicas descritas como ocorreram de forma sistemática para as posições 189 e 570. Quase metade dos isolados (42,5%, 37/87) apresentaram o nucleótido G ou o nucleótido degenerado R (A/G) em vez do A (74), e 28,7% (25/87) dos isolados apresentaram na posição 570 o nucleótido T ou o nucleótido degenerado Y (C/T), em vez do C (74). Para superar este problema uma abordagem *multilocus*, com o uso de pelo menos três marcadores genéticos, seria mais indicada. No entanto, este tipo de metodologia tem custos elevados e a dificuldade na distinção subgenotípica dentro do genótipo B permanece em muitos dos isolados analisados. De uma forma geral o que se verifica na análise *multilocus* é que os resultados de genotipagem são congruentes para os isolados pertencentes ao genótipo A, mas não para os isolados pertencentes ao B, onde o resultado obtido com um determinado marcador para um *locus* não é compatível com os resultados obtidos para os restantes *loci* (6,74). Inclusivamente, Lebbad *et al* (77) demonstrou grande dificuldade na separação entre isolados pertencentes ao genótipo BIII e BIV devido à sobreposição de nucleótidos (ocorrência de picos duplos no cromatograma) nas posições específicas que supostamente distinguiriam estes dois grupos genéticos, para qualquer um dos marcadores estudados (*bg*, *gdh* e *tpi*). Esta característica tem sido atribuída à mistura de infeções pelos subgenótipos ou à ASH, ou

à combinação de ambos os acontecimentos (77). Contudo, estes investigadores conseguiram chegar à conclusão de que os isolados que apresentavam picos duplos, para qualquer um dos três marcadores, estavam fortemente correlacionados ( $p < 0,001$ ) com infeções adquiridas fora da Europa, sugerindo que a mistura de subgenótipos é mais comum em regiões com prevalências de *Giardia* mais elevadas (77). Para dificultar esta situação, estudos que recorreram à técnica de PCR convencional (84) ou de PCR em tempo real (78) com *primers* específicos para cada genótipo revelaram um grau de infeções mistas em isolados humanos muito maior do que se supunha.

Até à data, este é o primeiro estudo realizado em Moçambique que investiga quais os genótipos de *G. duodenalis* em circulação, bem como a sua associação com a etiologia da doença diarreica, estado nutricional e infeção por VIH.

Como referido anteriormente, o genótipo B foi o mais comum na população estudada (72/87). De uma forma geral o genótipo B é o mais implicado na transmissão entre humanos, enquanto que o A é mais frequentemente associado à transmissão zoonótica (174). Apesar de não termos os dados relativos à existência de animais domésticos e/ou peridomésticos por parte do agregado familiar das crianças estudadas, Nampula é caracterizada pela ausência de animais domésticos como cães e gatos. Por exemplo, o Instituto Nacional de Estatística de Moçambique (175), num trabalho sobre a agricultura familiar em Moçambique (176), mostrou que as galinhas são o animal peridoméstico mais comum na província de Nampula. Para além disso, um estudo realizado com crianças brasileiras relatou que as crianças infetadas pelo genótipo B eliminavam um número superior de quistos nas fezes, comparativamente às que estavam infetadas pelo A, o que pode favorecer a sua transmissão (177). Este dado, em conjunto com o resultado da associação estatística obtida neste estudo para a infeção por *G. duodenalis* e a densidade de pessoas na habitação (discutida anteriormente) sustenta a hipótese de transmissão antroponótica. Adicionalmente, os dados relativos à subgenotipagem de A mostraram que na população estudada os subgenótipos A2 e A3 eram os predominantes (em seis e sete isolados, respetivamente) e de acordo com várias publicações o subgenótipo A1 é considerado como o mais capaz de causar transmissão zoonótica (6,74,178).

A questão da existência de uma relação entre a gravidade da giardíase e os respetivos genótipos é controversa. Alguns estudos indicam que o genótipo B está

associado a uma sintomatologia mais grave, enquanto que outros atribuem uma maior gravidade da doença ao genótipo A (49,90). Há ainda a considerar que a maioria destas investigações incluiu amostras de tamanho reduzido (6-138 casos de diarreia e infeção por *G. duodenalis* e 6-199 de indivíduos sem diarreia, mas infetados por este parasita). Estes estudos também variam em relação ao seu desenho, população estudada e as variáveis investigadas, pelo que é aconselhada prudência em relação às conclusões a retirar (159). Uma questão interessante levantada por Almeida e os seus colaboradores (78) é que parece haver uma relação entre o marcador molecular e o genótipo considerado mais agressivo. Assim, estes investigadores verificaram que quase todos os estudos de genotipagem baseados nos genes *ssurRNA* e *tpi* suportam a ideia de que o genótipo A está associado a doença sintomática, enquanto que os estudos baseados nos genes *bg* e *gdh* associam a sintomatologia com o genótipo B. Outro autor (90) coloca esta questão de um ponto de vista epidemiológico, sugerindo a hipótese de que nas regiões onde um determinado grupo genético é endémico, um novo grupo pode causar sintomas particularmente graves quando aparece pela primeira vez na população.

De acordo com os resultados apresentados neste trabalho, não foi encontrada nenhuma associação estatisticamente significativa entre a infeção pelo genótipo A ou B e a doença diarreica, bem como com qualquer outro sintoma relacionado com infeção gastrointestinal. Do mesmo modo, não se encontrou nenhuma associação estatisticamente significativa com o estado nutricional das crianças ou a infeção pelo VIH.

Apesar da variedade de resultados relatados para a associação entre os genótipos de *G. duodenalis* e a gravidade da doença, um estudo único mas de desenho longitudinal, realizado com crianças brasileiras também não encontrou nenhuma diferença significativa entre a duração da diarreia e episódios de diarreia na população estudada (177).

No que respeita à malnutrição apenas dois estudos, um realizado com crianças ruandesas e outro em crianças e adultos do Norte da Índia, relataram a associação entre o genótipo B e a desnutrição (121,179). Contudo os nossos resultados não revelaram nenhuma associação significativa entre a infeção pelos genótipos de *G. duodenalis* e qualquer um dos tipos de desnutrição.

Em relação ao VIH os trabalhos onde sejam incluídos os genótipos de *Giardia*



são ainda mais escassos. Apenas duas publicações tentam, sem sucesso, explorar este tipo de associação. Num dos trabalhos não se obteve um número de amostras suficientes para se prosseguir com a análise (138) e noutro *G. duodenalis* foi apenas identificada no grupo de indivíduos sem VIH (5/96) (137).

Os resultados do nosso estudo discutidos nos parágrafos precedentes poderão estar limitados pelo número de amostras genotipadas (87). Para a obtenção de resultados com precisão estatística este número teria que ser superior a 100. Deste modo não foi possível realizar um procedimento de regressão logística binária, que seria mais elucidativo por fornecer informação sobre o risco relativo das variáveis estudadas, através dos valores de OR e respetivos intervalos de confiança.

Em conclusão verifica-se que *G. duodenalis* foi o parasita mais frequentemente diagnosticado na população estudada, pelo que se deveria dar mais importância ao diagnóstico deste protozoário em crianças hospitalizadas com sintomas gastrointestinais, apesar de tal relação não ter sido encontrada no presente estudo. Por outro lado, o número de crianças com desnutrição grave é alarmante e evidencia as carências alimentares, consequência do nível de pobreza desta população. Tal como seria de esperar, crianças com idades inferiores a 24 meses pareceram ser as mais suscetíveis à desnutrição por baixo peso e aguda, a apresentarem diarreia, dor abdominal e falta de apetite, pelo que deveria haver uma sensibilização para um maior cuidado e acompanhamento do seu estado geral de saúde.

No presente trabalho não se encontrou nenhuma associação entre a infeção pelo genótipo A ou B de *G. duodenalis* e a gravidade da doença diarreica, o estado nutricional ou infeção pelo VIH. O número reduzido de publicações relativas ao estado nutricional e infeção pelo VIH dificultaram bastante a comparação com os resultados obtidos neste estudo, restringindo as respetivas conclusões. Pelo contrário, em relação à gravidade da doença diarreica existem várias publicações que demonstraram a existência de uma associação com um ou outro genótipo. No entanto, existe uma publicação onde, tal como no nosso caso, não foi encontrada nenhuma associação estatisticamente significativa entre a infeção pelos genótipos de *G. duodenalis* e a diarreia (177). Poder-se-á colocar a questão de que o número de isolados genotipados com sucesso (87) constituiu uma limitação que impossibilitou uma análise estatística mais completa. Além disso, o facto de se ter obtido uma única amostra de fezes por

criança poderá ter contribuído para uma menor sensibilidade do diagnóstico parasitológico, diminuindo consequentemente o número de potenciais isolados a serem genotipados.

Dentro deste contexto e tendo em conta os resultados apresentados nesta tese, seria interessante aplicar esta linha de investigação a outros contextos epidemiológicos semelhantes, de modo a contribuir para uma maior disponibilidade de dados relativos a esta temática, para um melhor esclarecimento do papel da infeção pelos diferentes genótipos de *G. duodenalis* no homem.

## ***5 Referências bibliográficas***



1. Harhay MO, Horton J, Olliaro PL. NIH Public Access. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2010;8(2):219–34.
2. Katona-Apte PK and J. The interaction between nutrition and infection. *Clin Pract.* 2008;46(10):1582–8.
3. Vargas M, Gasco J, Casals C, Schellenberg D, Urassa H, Kahigwa E, et al. Etiology of Diarrhea in Children Less Than Five Years of Age in. 2004;70(5):536–9.
4. Siddiqui U, Bini EJ, Chandarana K, Leong J, Ramsetty S, Schiliro D, et al. Prevalence and impact of diarrhea on health-related quality of life in HIV-infected patients in the era of highly active antiretroviral therapy. *J Clin Gastroenterol* [Internet]. 2007;41(5):484–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17450031>
5. Botero-Garcés JH, García-Montoya GM, Grisales-Patiño D, Aguirre-Acevedo DC, Álvarez-Urbe MC. *Giardia intestinalis* and nutritional status in children participating in the complementary nutrition program, Antioquia, Colombia, May to October 2006. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2009;51(3):155–62.
6. Feng Y, Xiao L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clin Microbiol Rev.* 2011;24(1):110–40.
7. Plutzer J, Ongerth J, Karanis P. *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions. *Int J Hyg Environ Health* [Internet]. Elsevier GmbH.; 2010;213(5):321–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2010.06.005>
8. Mohammed Mahdy a. K, Surin J, Wan KL, Mohd-Adnan a., Al-Mekhlafi MSH, Lim Y a L. *Giardia intestinalis* genotypes: Risk factors and correlation with clinical symptoms. *Acta Trop.* 2009;112(1):67–70.
9. Sahagún J, Clavel a., Goñi P, Seral C, Llorente MT, Castillo FJ, et al. Correlation between the presence of symptoms and the *Giardia duodenalis* genotype. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2008;27(1):81–3.
10. Hopkins RM, Meloni BP, Groth DM, Wetherall JD, Reynoldson J a, Thompson RC. Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. *J Parasitol.* 1997;83(1):44–51.
11. Read C, Walters J, Robertson ID, Thompson RC a. Correlation between genotype of *Giardia duodenalis* and diarrhoea. *Int J Parasitol.* 2002;32(2):229–31.
12. Laishram S, Kang G, Ajjampur SSR. Giardiasis: A review on assemblage distribution and epidemiology in India. *Indian J Gastroenterol.* 2012;31(1):3–12.
13. Moçambique M da AE da R de. Perfil do Distrito de Nampula, Província de Nampula. 2005.
14. Augusto G, Nalá R, Casmo V, Sabonete A, Mapaco L, Monteiro J. Geographic distribution and prevalence of schistosomiasis and soil-transmitted helminths among schoolchildren in mozambique. *Am J Trop Med Hyg.* 2009;81(5):799–803.
15. UNICEF. Nutritional Status of Children - Southern African Region. 2006.

16. Ministério da Saúde de Moçambique e Secretariado Técnico de Segurança Alimentar e Nutricional. Inquérito Nutricional Rápido - Das crianças dos 6 aos 59 meses dos distritos afectados pela seca. 2005.
17. Ministério da Saúde de Moçambique. Relatório sobre a revisão dos dados de vigilância epidemiológica do HIV. 2008.
18. Silva CDC. Universidade Nova de Lisboa. Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa; 2012.
19. Cox FEG. History of Human Parasitology History of Human Parasitology. Clin Microbiol Rev. 2002;15(4):595–612.
20. Pan-American Health Organization. Epidemiological Profiles of Neglected Tropical Diseases and Other Infections Related to Poverty in Latin America and the Caribbean. 2009;123.
21. Ault SK. Pan American Health Organization' s Regional Strategic Framework for addressing neglected diseases in neglected populations in Latin America and the Caribbean. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007;102(Supp. I):99–107.
22. Lustigman S, Prichard RK, Gazzinelli A, Grant WN, Boatin B a., McCarthy JS, et al. A research agenda for helminth diseases of humans: The problem of helminthiasis. PLoS Negl Trop Dis. 2012;6(4).
23. Stoll NR. This wormy world. J Parasitol. 1947;33(1):1–18.
24. Hotez PJ, Molyneux DH, Fenwick A, Kumaresan J, Sachs SE, Sachs JD, et al. Control of Neglected Tropical Diseases. N Engl J Med. 2007;1018–27.
25. Hotez PJ, Brindley PJ, Bethony JM, King CH, Pearce EJ, Jacobson J. Helminth infections: the great neglected tropical diseases. J Clin Invest. 2008;118(4):1311–21.
26. Savioli L, Smith H, Thompson a. Giardia and Cryptosporidium join the “Neglected Diseases Initiative.” Trends Parasitol. 2006;22(5):203–8.
27. Levine ND, Corliss JO, Cox FEG, Deroux G, Grain J, Honigberg BM, et al. A Newly Revised Classification of the Protozoa. J Protozool. 1980;27(1):37–58.
28. Roberts L, Janovy J. Other flagellated protozoa. In: McGrawHill, editor. Foundations of Parasitology. 7th ed. New York; 2005. p. 90–5.
29. Adam RD. Biology of Giardia lamblia. Clin Microbiol Rev. 2001;14(3):447–75.
30. Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G, Ey PL. Genetic diversity within the morphological species Giardia intestinalis and its relationship to host origin. Infect Genet Evol. 2003;3(1):29–38.
31. Cacciò SM, Ryan U. Molecular epidemiology of giardiasis. Mol Biochem Parasitol. 2008;160(2):75–80.
32. Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G, Ey PL. Molecular systematics of the parasitic protozoan Giardia intestinalis. Mol Biol Evol. 1999;16(9):1135–44.
33. Boontanom P, Mungthin M, Tan-ariya P, Naaglor T, Leelayoova S. Epidemiology of giardiasis and genotypic characterization of Giardia duodenalis in preschool children of a rural community, central Thailand. Trop Biomed. 2011;28(1):32–9.

34. Traub RJ, Monis PT, Robertson I, Irwin P, Mencke N, Thompson RC a. Epidemiological and molecular evidence supports the zoonotic transmission of *Giardia* among humans and dogs living in the same community. *Parasitology*. 2004;128(Pt 3):253–62.
35. Inpankaew T, Traub R, Thompson RCA, Sukthana Y. Canine parasitic zoonoses in Bangkok temples. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2007;38(2):247–55.
36. Ortega YR, Adam RD. *Giardia* : Overview and Update. *Clin Infect Dis*. 1997;25(3):545–9.
37. Gardner TB, Hill DR. Treatment of giardiasis. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14(1):114–28.
38. Ryan U, Cacciò SM. Zoonotic potential of *Giardia*. *Int J Parasitol. Australian Society for Parasitology Inc.*; 2013;43(12–13):943–56.
39. Baldursson S, Karanis P. Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks - An update 2004-2010. *Water Res*. 2011;45(20):6603–14.
40. Center for Disease Control and Prevention. CDC - DPDx -Giardiasis [Internet]. [cited 2017 Feb 22]. Available from: <https://www.cdc.gov/dpdx/giardiasis/>
41. World Health Organization. The World Health Report 1996 - Fighting disease fostering development. WHO, editor. Geneva: WH; 1996. 1-12 p.
42. Thompson RCA. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. *Vet Parasitol*. 2004;126(1–2 SPEC.ISS.):15–35.
43. Polis M a., Tuazon CU, Alling DW, Talmanis E. Transmission of *Giardia lamblia* from a day care center to the community. *Am J Public Health*. 1986;76(9):1142–4.
44. Saksirisampant W, Wiwanitkit V, Ampavasiri A, Nuchprayoon S, Yenthakam S. Intestinal parasitic infestations among children in an orphanage in Pathum Thani province. *J Med Assoc Thail*. 2003;86(SUPPL. 2).
45. Ratanapo S, Mungthin M, Soontrapa S, Faithed C, Siripattanapipong S, Rangsin R, et al. Multiple modes of transmission of giardiasis in primary schoolchildren of a rural community, Thailand. *Am J Trop Med Hyg*. 2008;78(4):611–5.
46. Thompson RC a, Monis PT. Variation in *Giardia*: Implications for taxonomy and epidemiology. *Adv Parasitol*. 2004;58(4):69–137.
47. Lane S, Lloyd D. Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. *Crit Rev Microbiol*. 2002;28(2):123–47.
48. Durigan M, Abreu AG, Zucchi MI, Franco RMB, de Souza AP. Genetic Diversity of *Giardia duodenalis*: Multilocus Genotyping Reveals Zoonotic Potential between Clinical and Environmental Sources in a Metropolitan Region of Brazil. *PLoS One*. 2014;9(12):e115489.
49. Cotton J a., Beatty JK, Buret AG. Host parasite interactions and pathophysiology in *Giardia* infections. *Int J Parasitol. Australian Society for Parasitology Inc.*; 2011;41(9):925–33.

50. Wolfe MS. Giardiasis. *Clin Microbiol Rev.* 1992;5(1):93–100.
51. Lynne S. Intestinal protozoa: flagellates and ciliates. *Diagnostic Medical Parasitology*. 4th ed. Washington DC: ASM Press Washington; 2001. p. 36–49.
52. Kelly P. Intestinal Protozoa. In: Farrar J, Hotez PJ, Junghanss T, Kang G, Lalloo D, White N, editors. *Manson's Tropical Diseases*. 23rd ed. Elsevier Saunders; 2014. p. 671–5.
53. Kucik CJ, Martin GL, Sortor B V. Common Intestinal Parasites. *Am Fam Physician*. 2004;69(5):1161–8.
54. Wielinga CM, Thompson RC a. Comparative evaluation of *Giardia duodenalis* sequence data. *Parasitology*. 2007;134:1795–821.
55. Mahbubani MH, Bej a. K, Perlin MH, Schaefer FW, Jakubowski W, Atlas RM. Differentiation of *Giardia duodenalis* from other *Giardia* spp. by using polymerase chain reaction and gene probes. *J Clin Microbiol*. 1992;30(1):74–8.
56. Cacciò SM, Thompson RCA, McLauchlin J, Smith H V. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends Parasitol*. 2005;21(9):430–7.
57. Lalle M, Pozio E, Capelli G, Bruschi F, Crotti D, Cacciò SM. Genetic heterogeneity at the  $\beta$ -giardin locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. *Int J Parasitol*. 2005;35(2):207–13.
58. Lalle M, Jimenez-Cardosa E, Cacciò SM, Pozio E. Genotyping of *Giardia duodenalis* from humans and dogs from Mexico using beta-giardin nested polymerase chain reaction assay. *J Parasitol*. 2005;91(1):203–5.
59. Wielinga C, Ryan U, Andrew Thompson RC, Monis P. Multi-locus analysis of *Giardia duodenalis* intra-Assemblage B substitution patterns in cloned culture isolates suggests sub-Assemblage B analyses will require multi-locus genotyping with conserved and variable genes. *Int J Parasitol. Australian Society for Parasitology Inc.*; 2011;41(5):495–503.
60. van der Giessen JWB, de Vries a., Roos M, Wielinga P, Kortbeek LM, Mank TG. Genotyping of *Giardia* in Dutch patients and animals: A phylogenetic analysis of human and animal isolates. *Int J Parasitol*. 2006;36(7):849–58.
61. Robertson LJ, Hermansen L, Gjerde BK, Strand E, Langeland N, Alvsva JO. Application of Genotyping during an Extensive Outbreak of Waterborne Giardiasis in Bergen , Norway , during Autumn and Winter 2004 Application of Genotyping during an Extensive Outbreak of Waterborne Giardiasis in Bergen , Norway , during Autumn and Winte. 2006;72(3):2212–7.
62. Robertson LJ, Forberg T, Hermansen L, Gjerde BK, Langeland N. Molecular characterisation of *Giardia* isolates from clinical infections following a waterborne outbreak. *J Infect*. 2007;55(1):79–88.
63. Volotão a. C, Costa-Macedo LM, Haddad FSM, Brandão a., Peralta JM, Fernandes O. Genotyping of *Giardia duodenalis* from human and animal samples from Brazil using  $\beta$ -giardin gene: A phylogenetic analysis. *Acta Trop*. 2007;102(1):10–9.
64. Read CM, Monis PT, Thompson RC a. Discrimination of all genotypes of



- Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. *Infect Genet Evol.* 2004;4(2):125–30.
65. Lasek-Nesselquist E, Welch DM, Thompson RCA, Steuart RF, Sogin ML. Genetic exchange within and between assemblages of *Giardia duodenalis*. *J Eukaryot Microbiol.* 2009;56(6):504–18.
  66. Sulaiman IM, Fayer R, Bern C, Gilman RH, Trout JM, Schantz PM, et al. Triosephosphate Isomerase Gene Characterization and Potential Zoonotic Transmission of *Giardia duodenalis*. *Emerg Infect Dis.* 2003;9(11):1444–52.
  67. Cacciò SM, De Giacomo M, Pozio E. Sequence analysis of the  $\beta$ -giardin gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. *Int J Parasitol.* 2002;32(8):1023–30.
  68. Drouin G, de Sá MM, Zuker M. The *Giardia lamblia* actin gene and the phylogeny of eukaryotes. *J Mol Evol.* 1995;41(6):841–9.
  69. Kim J, Bae SS, Sung MH, Lee KH, Park SJ. Comparative proteomic analysis of trophozoites versus cysts of *Giardia lamblia*. *Parasitol Res.* 2009;104(2):475–9.
  70. Lee GC, Nam SH, Chae JC, Lee CH. *Giardia duodenalis*: Improved detection of viable cysts by reverse transcription-PCR of heat shock-inducible hsp70 gene. *Exp Parasitol.* Elsevier Inc.; 2009;123(4):377–80.
  71. Yong T, Han K, Yang H, Park S. PCR-RFLP analysis of *Giardia intestinalis* using a *Giardia*-specific gene, GLORF-C4. *Parasite.* 2002;9(1):65–70.
  72. Lee J-H, Lee J, Park S-J, Yong T-S, Hwang U-W. Detection and genotyping of *Giardia intestinalis* isolates using intergenic spacer (IGS)-based PCR. *Korean J Parasitol.* 2006;44(4):343–53.
  73. Cacciò SM, Beck R, Almeida A, Bajer A, Pozio E. Identification of *Giardia* species and *Giardia duodenalis* assemblages by sequence analysis of the 5.8S rDNA gene and internal transcribed spacers. *Parasitology.* 2010;137(6):919–25.
  74. Cacciò SM, Beck R, Lalle M, Marinculic a., Pozio E. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* reveals striking differences between assemblages A and B. *Int J Parasitol.* 2008;38(13):1523–31.
  75. Geurden T, Geldhof P, Levecke B, Martens C, Berkvens D, Casaert S, et al. Mixed *Giardia duodenalis* assemblage A and E infections in calves. *Int J Parasitol.* 2008;38(2):259–64.
  76. Levecke B, Geldhof P, Claerebout E, Dorny P, Vercammen F, Cacciò SM, et al. Molecular characterisation of *Giardia duodenalis* in captive non-human primates reveals mixed assemblage A and B infections and novel polymorphisms. *Int J Parasitol.* Australian Society for Parasitology Inc.; 2009;39(14):1595–601.
  77. Lebbad M, Petersson I, Karlsson L, Botero-Kleiven S, Andersson JO, Svenungsson B, et al. Multilocus genotyping of human giardia isolates suggests limited zoonotic transmission and association between assemblage B and flatulence in children. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(8):1–10.
  78. Almeida A, Pozio E, Cacciò SM. Genotyping of *Giardia duodenalis* cysts by new real-time PCR assays for detection of mixed infections in human samples. *Appl*

- Environ Microbiol. 2010;76(6):1895–901.
79. Eligio-García L, Cortes-Campos A, Cota-Guajardo S, Gaxiola S, Jiménez-Cardoso E. Frequency of *Giardia intestinalis* assemblages isolated from dogs and humans in a community from Culiacan, Sinaloa, Mexico using  $\beta$ -giardin restriction gene. Vet Parasitol. 2008;156(3–4):205–9.
  80. Lebbad M, Ankarklev J, Tellez A, Leiva B, Andersson JO, Svård S. Dominance of *Giardia* assemblage B in León, Nicaragua. Acta Trop. 2008;106(1):44–53.
  81. Minvielle MC, Molina NB, Polverino D, Basualdo J a. First genotyping of *Giardia lamblia* from human and animal feces in Argentina, South America. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2008;103(1):98–103.
  82. Bertrand I, Albertini L, Schwartzbrod J. Comparison of Two Target Genes for Detection and Genotyping of *Giardia lamblia* in Human Feces by PCR and PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Comparison of Two Target Genes for Detection and Genotyping of *Giardia lamblia* in Human Feces by PCR and . J Clin Microbiol. 2005;43(12):5940–4.
  83. Ajampur SSR, Sankaran P, Kannan A, Sathyakumar K, Sarkar R, Gladstone BP, et al. *Giardia duodenalis* assemblages associated with diarrhea in children in South India identified by PCR-RFLP. Am J Trop Med Hyg. 2009;80(1):16–9.
  84. Geurden T, Levecke B, Cacció SM, Visser A, De Groote G, Casaert S, et al. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium* and *Giardia* in non-outbreak related cases of diarrhoea in human patients in Belgium. Parasitology. 2009;136(10):1161–8.
  85. Puebla LJ, Núñez F a., Fernández YA, Fraga J, Rivero LR, Millán IA, et al. Correlation of *Giardia duodenalis* assemblages with clinical and epidemiological data in Cuban children. Infect Genet Evol. Elsevier B.V.; 2014;23:7–12.
  86. Farthing M. Giardiasis. Gastroenterol Clin North Am. 1996;25(3):493–515.
  87. Eckmann L. Mucosal defences against *Giardia*. Parasite Immunol. 2003;25(5):259–70.
  88. Tungtrongchitr A, Sookrung N, Indrawattana N, Kwangsi S, Ongrotchanakun J, Chaicumpa W. *Giardia intestinalis* in Thailand: Identification of genotypes. J Heal Popul Nutr. 2010;28(1):42–52.
  89. Gorczynski RM, Terzioglu E. Aging and the immune system. Int Urol Nephrol. 2008;40(4):1117–25.
  90. Robertson LJ, Hanevik K, Escobedo A a., Mørch K, Langeland N. Giardiasis - why do the symptoms sometimes never stop? Trends Parasitol. 2010;26(2):75–82.
  91. World Health Organization. The Treatment of Diarrhea, A manual for physicians and other senior health workers. 4th ed. WHO, editor. Geneva: WHO; 2005. 1-50 p.
  92. Al-Mohammed HI. Genotypes of *Giardia intestinalis* clinical isolates of gastrointestinal symptomatic and asymptomatic Saudi children. Parasitol Res. 2011;108(6):1375–81.
  93. Haque R, Roy S, Kabir M, Stroup SE, Mondal D, Houpt ER. *Giardia* Assemblage

- A Infection and Diarrhea in Bangladesh. *J Infect Dis.* 2005;192(12):2171–3.
94. Pelayo L, Nuñez F a, Rojas L, Furuseth Hansen E, Gjerde B, Wilke H, et al. Giardia infections in Cuban children: the genotypes circulating in a rural population. *Ann Trop Med Parasitol.* 2008;102(7):585–95.
  95. Helmy MMF, Abdel-Fattah HS, Rashed L. Real-time PCR/RFLP assay to detect Giardia intestinalis genotypes in human isolates with diarrhea in Egypt. *J Parasitol.* 2009;95(4):1000–4.
  96. Gelanew T, Lalle M, Hailu A, Pozio E, Cacciò SM. Molecular characterization of human isolates of Giardia duodenalis from Ethiopia. *Acta Trop.* 2007;102(2):92–9.
  97. Breathnach a S, McHugh TD, Butcher PD. Prevalence and clinical correlations of genetic subtypes of Giardia lamblia in an urban setting. *Epidemiol Infect.* 2010;138(10):1459–67.
  98. Pestechian N, Rasekh H, Rostami-nejad M, Yousofi HA. Molecular identification of Giardia lamblia ; is there any correlation between diarrhea and genotyping in Iranian population ? *Gastroenterol Hepatol from bed to bench.* 2014;7(1):168–72.
  99. Homan WL, Mank TG. Human giardiasis: Genotype linked differences in clinical symptomatology. *Int J Parasitol.* 2001;31(8):822–6.
  100. Pérez Cordon G, Cordova Paz Soldan O, Vargas Vásquez F, Velasco Soto JR, Sempere Bordes L, Sánchez Moreno M, et al. Prevalence of enteroparasites and genotyping of Giardia lamblia in Peruvian children. *Parasitol Res.* 2008;103(2):459–65.
  101. Aydin AF, Besirbellioglu B a., Avci IY, Tanyuksel M, Araz E, Pahsa A. Classification of Giardia duodenalis parasites in Turkey into groups a and B using restriction fragment length polymorphism. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2004;50(2):147–51.
  102. Monis PT, Caccio SM, Thompson RCA. Variation in Giardia: towards a taxonomic revision of the genus. *Trends Parasitol.* 2009;25(2):93–100.
  103. Morris SS, Cogill B, Uauy R. Effective international action against undernutrition: why has it proven so difficult and what can be done to accelerate progress? *Lancet.* 2008;371(9612):608–21.
  104. Blössner M, Onis M De. Malnutrition: quantifying the health impact at national and local levels. Annette Prüss-Üstün, Diarmid Campbell-Lendrum, Carlos Corvalán AW, editor. *Environmental Burden Disease Series.* Geneva: World Health Organization; 2005. 1-43 p.
  105. Black RE, Victora CG, Walker SP, Bhutta Z a., Christian P, De Onis M, et al. Maternal and child undernutrition and overweight in low-income and middle-income countries. *Lancet.* 2013;382(9890):427–51.
  106. Bhutta Z a., Ahmed T, Black RE, Cousens S, Dewey K, Giugliani E, et al. What works? Interventions for maternal and child undernutrition and survival. *Lancet.* 2008;371(9610):417–40.
  107. Kau AL, Ahern PP, Griffin NW, Goodman AL, Jeffrey I. Human nutrition, the gut microbiome, and immune system: envisioning the future. *Nature.*

2011;474(7351):327–36.

108. De Onis M, Onyango A, Borghi E, Garza C, Yang H. Comparison of the World Health Organization (WHO) Child Growth Standards and the National Center for Health Statistics/WHO international growth reference: implications for child health programmes. 2006;9(7):942–7. Available from: about:newtab
109. Casapía M, Joseph S a, Núñez C, Rahme E, Gyorkos TW. Parasite and maternal risk factors for malnutrition in preschool-age children in Belen, Peru using the new WHO Child Growth Standards. *Br J Nutr.* 2007;98:1259–66.
110. World Vision. A Hunger Free World [Internet]. [cited 2016 Apr 19]. Available from: <http://services.worldvision.org.hk/eng/famine/definition-of-hunger.asp>
111. Guerra A. Avaliação do Estado de Nutrição. In: Silva, Aires Cleofas da; Gomes-Pedro J, editor. *Nutrição Pediátrica: Princípios Básicos*. Lisboa: Clínica Universitária de Pediatria Hospital de Santa Maria; 2005.
112. WHO. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee. World Health Organization technical report series. Geneva; 1995.
113. Bloss E, Wainaina F, Bailey RC. Prevalence and predictors of underweight, stunting, and wasting among children aged 5 and under in Western Kenya. *J Trop Pediatr.* 2004;50(5):260–70.
114. UNICEF/WHO. Diarrhoea: Why children are still dying and what can be done. 1st ed. UNICEF/WHO, editor. New York (UNICEF), Geneva (WHO): UNICEF/WHO; 2009. 1-68 p.
115. Oliveira Assis AM, Barreto ML, Magalhães de Oliveira LP, de Oliveira VA, da Silva Prado M, da Silva Gomes GS, et al. Determinants of mild-to-moderate malnutrition in preschoolers in an urban area of Northeastern Brazil: a hierarchical approach. *Public Health Nutr.* 2007;11(4):387–94.
116. Yang H, de Onis M. Algorithms for converting estimates of child malnutrition based on the NCHS reference into estimates based on the WHO Child Growth Standards. *BMC Pediatr.* 2008;8:19.
117. Lenters LM, Wazny K, Webb P, Ahmed T, Bhutta Z a. Treatment of severe and moderate acute malnutrition in low- and middle-income settings: a systematic review, meta-analysis and Delphi process. *BMC Public Health. BioMed Central Ltd;* 2013;13(Suppl 3):S23.
118. Prendergast AJ, Humphrey JH. The stunting syndrome in developing countries. *Paediatr Int Child Health.* 2014;34(4):250–65.
119. Ds B, Ag L, Rh G, Sl L, Black M. Effect of stunting, diarrhoeal disease, and parasitic infection during infancy on cognition in late hildhood: a follow-up study. *Lancet.* 2002;359:564–71.
120. Simsek Z, Zeyrek FY, Kurcer M a. Effect of Giardia Infection on Growth and Psychomotor Development of Children Aged 0 – 5 Years. *J Trop Pediriatrics.* 2004;50(2):90–3.
121. Ignatius R, Gahutu JB, Klotz C, Steininger C, Shyirambere C, Lyng M, et al. High prevalence of giardia duodenalis assemblage b infection and association

- with underweight in rwandan children. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(6).
122. Nematian J, Gholamrezanezhad a, Nematian E. Giardiasis and other intestinal parasitic infections in relation to anthropometric indicators of malnutrition: a large, population-based survey of schoolchildren in Tehran. *Ann Trop Med Parasitol*. 2008;102(3):209–14.
  123. Fraser D, Bilenko N, Deckelbaum RJ, Dagan R, El-On J, Naggan L. Giardia lamblia Carriage in Israeli Bedouin Infants: RIsk Factors and Consequences. *Clinical Infectious Diseases*. 2000;19–24.
  124. Newman RD, Moore SR, Lima A a M, Nataro JP, Guerrant RL, Sears CL. A longitudinal study of Giardia lamblia infection in north-east Brazilian children. *Trop Med Int Heal*. 2001;6(8):624–34.
  125. Al-Mekhlafi HMS, Azlin M, Nor Aini U, Shaik a., Sa'iah a., Fatmah MS, et al. Protein-energy malnutrition and soil-transmitted helminthiasis among Orang Asli children in Selangor, Malaysia. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2005;14(2):188–94.
  126. Carvalho-Costa FA, Gonçalves AQ, Lassance SL, Silva Neto LM Da, Salmazo CAA, Bóia MN. Giardia lamblia and other intestinal parasitic infections and their relationships with nutritional status in children in Brazilian Amazon. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2007;49(3):147–53.
  127. Kelly P, Todd J, Sianongo S, Mwansa J, Sinsungwe H, Katubulushi M, et al. Susceptibility to intestinal infection and diarrhoea in Zambian adults in relation to HIV status and CD4 count. *BioMed Cent*. 2011;9(7):1–11.
  128. Adamu H, Wegayehu T, Petros B. High Prevalence of Diarrhoeogenic Intestinal Parasite Infections among Non-ART HIV Patients in Fitch Hospital, Ethiopia. *PLoS One*. 2013;8(8):5–9.
  129. Ngui R, Ishak S, Chuen CS, Mahmud R, Lim Y a L. Prevalence and risk factors of intestinal parasitism in rural and remote West Malaysia. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(3):1–7.
  130. Xiao L, Fayer R. Molecular characterisation of species and genotypes of Cryptosporidium and Giardia and assessment of zoonotic transmission. *Int J Parasitol*. 2008;38(11):1239–55.
  131. Agholi M, Hatam GR, Motazedian MH. HIV/AIDS-Associated Opportunistic Protozoal Diarrhea. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2012;29(1):120911064948006.
  132. Hailemariam G, Kassu A, Abebe G, Abate E, Damte D, Mekonnen E, et al. Intestinal parasitic infections in HIV/AIDS and HIV seronegative individuals in a Teaching Hospital, Ethiopia. *Jpn J Infect Dis*. 2004;57(2):41–3.
  133. Sanyaolu AO, Oyibo W a., Fagbenro-Beyioku AF, Gbadegeshin AH, Iriemenam NC. Comparative study of entero-parasitic infections among HIV sero-positive and sero-negative patients in Lagos, Nigeria. *Acta Trop [Internet]*. Elsevier B.V.; 2011;120(3):268–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.08.009>
  134. Taye B, Desta K, Ejigu S, Dori GU. The magnitude and risk factors of intestinal parasitic infection in relation to Human Immunodeficiency Virus infection and immune status, at ALERT Hospital, Addis Ababa, Ethiopia. *Parasitol Int*.

Elsevier Ireland Ltd; 2014;63(3):550–6.

135. Janagond AB, Sasikala G, Agatha D, Ravinder T, Thenmozhi Valli PR. Enteric parasitic infections in relation to Diarrhoea in HIV infected individuals with CD4 t cell counts <1000 cells/μl in Chennai, India. *J Clin Diagnostic Res*. 2013;7(10):2160–2.
136. Fregonesi BM, Suzuki MN, Machado CS, Tonani KADA, Fernandes APM, Monroe AA, et al. Emergent and re-emergent parasites in HIV-infected children: Immunological and socio-environmental conditions that are involved in the transmission of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015;48(6):753–8.
137. Maikai B V., Umoh JU, Lawal I a., Kudi AC, Ejembi CL, Xiao L. Molecular characterizations of *Cryptosporidium*, *Giardia*, and *Enterocytozoon* in humans in Kaduna State, Nigeria. *Exp Parasitol*. Elsevier Inc.; 2012;131(4):452–6.
138. Lim Y a L, Iqbal A, Surin J, Sim BLH, Jex AR, Nolan MJ, et al. First genetic classification of *Cryptosporidium* and *Giardia* from HIV/AIDS patients in Malaysia. *Infect Genet Evol*. Elsevier B.V.; 2011;11(5):968–74.
139. Portal do Governo de Moçambique. Geografia de Moçambique [Internet]. [cited 2011 Sep 15]. Available from: <http://www.portaldogoverno.gov.mz/por/Mocambique/Geografia-de-Mocambique>
140. Moçambique P do G de. Informação Geral sobre Moçambique [Internet]. [cited 2011 Sep 15]. Available from: <http://www.portaldogoverno.gov.mz/por/Mocambique/Informacao-Geral>
141. UNICEF. MOZ - UNICEF DATA [Internet]. [cited 2011 Sep 15]. Available from: <https://data.unicef.org/country/moz/>
142. ICAP Columbia University. Mozambique Nampula [Internet]. 2011 [cited 2015 Apr 11]. Available from: [https://icapdatadissemination.wikischolars.columbia.edu/file/view/Mozambique\\_Nampula\\_18April\\_2011.jpg/406755634/Mozambique\\_Nampula\\_18April\\_2011.jpg](https://icapdatadissemination.wikischolars.columbia.edu/file/view/Mozambique_Nampula_18April_2011.jpg/406755634/Mozambique_Nampula_18April_2011.jpg)
143. Assembleia da República de Moçambique. Lei n° 6/92. Sistema Nacional de Educacao. Assembleia da República de Moçambique; 1992. p. n° 6/92.
144. World Health Organization. Preventive chemotherapy in human helminthiasis : coordinated use of anthelmintic drugs in control interventions : a manual for health professionals and programme managers. WHO. Geneva: WHO Press; 2006. 62 p.
145. World Health Organization. Haemoglobin concentrations for the diagnosis of anaemia and assessment of severity. Vitamin and Mineral Nutrition Information System [Internet]. WHO, editor. WHO. Geneva; 2011. 1-6 p. Available from: [www.who.int/vmnis/indicators/haemoglobin.pdf](http://www.who.int/vmnis/indicators/haemoglobin.pdf)
146. Julio C, Vilares A, Oleastro M, Ferreira I, Gomes S, Monteiro L, et al. Prevalence and risk factors for *Giardia duodenalis* infection among children: A case study in Portugal. *Parasit Vectors*. BioMed Central Ltd; 2012;5(1):22.

147. Nematian J, Nematian E, Gholamrezanezhad A, Asgari AA. Prevalence of intestinal parasitic infections and their relation with socio-economic factors and hygienic habits in Tehran primary school students. *Acta Trop*. 2004;92(3):179–86.
148. Siwila J, Phiri IGK, Enemark HL, Nchito M, Olsen A. Intestinal helminths and protozoa in children in pre-schools in Kafue district, Zambia. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2010;104(2):122–8.
149. Pereira MDGC, Atwill ER, Barbosa AP. Prevalence and associated risk factors for *Giardia lamblia* infection among children hospitalized for diarrhea in Goiânia, Goiás State, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2007;49(3):139–45.
150. Spinelli R, Brandonisio O, Serio G, Trerotoli P, Ghezzi F, Carito V, et al. Intestinal parasites in healthy subjects in Albania. *Eur J Epidemiol*. 2006;21(2):161–6.
151. Wongstitwilairoong B, Srijan A, Serichantalergs O, Fukuda CD, Mcdaniel P, Bodhidatta L, et al. Intestinal parasitic infections among pre-school children in Sangkhlaburi, Thailand. *Am J Trop Med Hyg*. 2007;76(2):345–50.
152. Raso G, Luginbühl A, Adjoua C a., Tian-Bi NT, Silué KD, Matthys B, et al. Multiple parasite infections and their relationship to self-reported morbidity in a community of rural Côte d'Ivoire. *Int J Epidemiol*. 2004;33(5):1092–102.
153. Mehraj V, Hatcher J, Akhtar S, Rafique G, Beg MA. Prevalence and factors associated with intestinal parasitic infection among children in an urban slum of Karachi. *PLoS One*. 2008;3(11).
154. Nkrumah B, Nguah SB. *Giardia lamblia*: a major parasitic cause of childhood diarrhoea in patients attending a district hospital in Ghana. *Parasit Vectors* [Internet]. BioMed Central Ltd; 2011;4(1):163. Available from: <http://www.parasitesandvectors.com/content/4/1/163>
155. Mandomando IM, Macete E V, Ruiz J, Sanz S, Abacassamo F, Vallès X, et al. Etiology of diarrhea in children younger than 5 years of age admitted in a rural hospital of southern Mozambique. *Am J Trop Med Hyg*. 2007;76(3):522–7.
156. Quihui-Cota L, Valencia ME, Crompton DWT, Phillips S, Hagan P, Diaz-Camacho SP, et al. Prevalence and intensity of intestinal parasitic infections in relation to nutritional status in Mexican schoolchildren. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2004;98(11):653–9.
157. Prado MS, Strina a, Barreto ML, Oliveira-Assis AM, Paz LM, Cairncross S. Risk factors for infection with *Giardia duodenalis* in pre-school children in the city of Salvador, Brazil. *Epidemiol Infect*. 2003;131(2):899–906.
158. Alyousefi N a., Mahdy M a K, Mahmud R, Lim Y a L. Factors associated with high prevalence of intestinal protozoan infections among patients in Sana'a city, Yemen. *PLoS One*. 2011;6(7).
159. Muhsen K, Levine MM. A systematic review and meta-analysis of the association between *giardia lamblia* and endemic pediatric diarrhea in developing countries. *Clin Infect Dis*. 2012;55(SUPPL. 4).
160. Mahmud M a., Chappell CL, Hossain MM, Huang DB, Habib M, DuPont HL.

- Impact of breast-feeding on *Giardia lamblia* infections in Bilbeis, Egypt. *Am J Trop Med Hyg.* 2001;65(3):257–60.
161. Moyo SJ, Gro N, Matee MI, Kitundu J, Myrmel H, Mylvaganam H, et al. Age specific aetiological agents of diarrhoea in hospitalized children aged less than five years in Dar es Salaam, Tanzania. *BMC Pediatr.* BioMed Central Ltd; 2011;11(1):19.
  162. Müller N, Von Allmen N. Recent insights into the mucosal reactions associated with *Giardia lamblia* infections. *Int J Parasitol.* 2005;35(13):1339–47.
  163. Ish-Horowicz M, Korman SH, Shapiro M, Har-Even U, Tamir I, Strauss N DR. Asymptomatic giardiasis in children. *Pediatr Infect Dis.* 1989;8(11):773–9.
  164. Merck & Co. I. Perturbações da nutrição e do metabolismo. In: Oceano Grupo Editorial SA, editor. *Manual MSD.* New Jersey: MM, Merck & Co., Inc; 2009.
  165. Vesey CJ, Peterson WL. The management of Giardiasis. *Aliment Pharmacol Ther.* 1999;13(7):843–50.
  166. Kotloff KL, Nataro JP, Blackwelder WC, Nasrin D, Farag TH, Panchalingam S, et al. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): A prospective, case-control study. *Lancet.* 2013;382(9888):209–22.
  167. Fonseca AM, Fernandes N, Ferreira FS, Gomes J, Centeno-Lima S. Intestinal parasites in children hospitalized at the Central Hospital in Maputo, Mozambique. *J Infect Dev Ctries.* 2014;8(6):786–9.
  168. Keusch GT, Fontaine O, Bhargava A, Boschi- C, Bhutta Z a, Gotuzzo E, et al. Diarrheal Diseases. *Disease Control Priorities in Developing Countries.* 2006. p. 371–87.
  169. Ochoa TJ, Salazar-Lindo E, Cleary TG. Management of children with infection-associated persistent diarrhea. *Semin Pediatr Infect Dis.* 2004;15(4):229–36.
  170. Di Cristanziano V, Santoro M, Parisi F, Albonico M, Shaali M a., Di Cave D, et al. Genetic characterization of *Giardia duodenalis* by sequence analysis in humans and animals in Pemba Island, Tanzania. *Parasitol Int.* Elsevier Ireland Ltd; 2014;63(2):438–41.
  171. Center for Disease Control and Prevention. CDC - DPDx - Diagnostic Procedures - Other Specimens [Internet]. 2016 [cited 2017 Feb 10]. Available from: <https://www.cdc.gov/dpdx/diagnosticProcedures/other/sputum.html>
  172. Holberton D, Baker D a., Marshall J. Segmented alpha-helical coiled-coil structure of the protein giardin from the *Giardia* cytoskeleton. *J Mol Biol.* 1988;204(3):789–95.
  173. Faubert G. Immune response to *Giardia duodenalis*. *Clin Microbiol Rev.* 2000;13(1):35–54, table of contents.
  174. Soliman RH, Fuentes I, Rubio JM. Identification of a novel Assemblage B subgenotype and a zoonotic Assemblage C in human isolates of *Giardia intestinalis* in Egypt. *Parasitol Int.* Elsevier Ireland Ltd; 2011;60(4):507–11.
  175. Instituto Nacional de Estatística de Moçambique. CENSO AGRO-PECUÁRIO 2009-2010: Resultados Preliminares - Mocambique. Maputo; 2011.



176. Siteo T a. Agricultura familiar em Moçambique estratégias de desenvolvimento sustentável. Maputo; 2005.
177. Kohli A, Bushen OY, Pinkerton RC, Houpt E, Newman RD, Sears CL, et al. *Giardia duodenalis* assemblage, clinical presentation and markers of intestinal inflammation in Brazilian children. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008;102(7):718–25.
178. Alyousefi N a., Mahdy M a K, Xiao L, Mahmud R, Lim Y a L. Molecular characterization of *Giardia duodenalis* in Yemen. *Exp Parasitol. Elsevier Inc.*; 2013;134(2):141–7.
179. Ghoshal U, Shukla R, Pant P, Ghoshal UC. Frequency, diagnostic performance of coproantigen detection and genotyping of the *Giardia* among patients referred to a multi-level teaching hospital in northern India. *Pathog Glob Health. Taylor & Francis*; 2016;110(7–8):316–20.



## **Anexo I**



## CONSENTIMENTO INFORMADO

### **Estudo do perfil epidemiológico molecular de *Giardia duodenalis* em crianças dos 0 aos 59 meses de idade no Hospital Central de Nampula e sua associação com o estado nutricional, diarreia e VIH.**

**Promotores:** Instituto de Higiene e Medicina Tropical e Hospital Central de Nampula

Os parasitas intestinais são um problema de saúde nas crianças em todo o mundo, podendo ser em geral adquiridos através de água ou alimentos contaminados. Alguns destes parasitas podem tornar o seu filho mais fraco e sujeito a vir a ter outras doenças tais como anemia, diarreia, malnutrição. Os parasitas têm tratamentos simples mas específicos. Se o seu filho estiver parasitado e não for devidamente tratado, pode vir a ter problemas no seu crescimento e desenvolvimento.

#### **O que pretendemos nós fazer?**

Com este estudo queremos perceber melhor a forma como os parasitas intestinais se relacionam com a malnutrição, diarreia e VIH/SIDA nas crianças dos 0-59 meses do Hospital Central de Nampula.

#### **O que tenho que fazer para participar no estudo?**

Gostaríamos de lhe pedir que colha 1 amostra de fezes e que autorize que a sua criança seja pesada e medida. Gostaríamos também que respondesse a algumas questões sobre condições de habitação, acesso a água e saneamento. Todas as informações recolhidas serão mantidas confidenciais.

#### **Quais são os benefícios do estudo?**

Os resultados deste estudo vão ajudar-nos a compreender melhor o impacto dos parasitas intestinais no estado nutricional, doença diarreica e HIV/SIDA nas crianças dos 0-59 meses. Se o seu filho estiver infectado com parasitas intestinais será tratado pelo médico ou enfermeiro assistente.

#### **Quais são os riscos se participar neste estudo?**

Não há nenhum risco relacionado com a colheita de fezes, pesagem ou medição que são processos não invasivos e não causam dor. O tratamento também é seguro e será acompanhado por técnicos de saúde.

#### **Posso recusar a participação do meu filho no estudo?**

Sim, pode recusar que o seu filho participe. Se recusar, não haverá nenhuma consequência negativa.

#### **O que acontecerá depois do estudo?**

As amostras de fezes e as informações sobre o seu filho serão estudadas e os resultados serão transmitidos aos médicos que o estão a tratar.

**Se ainda tiver perguntas sobre este estudo, pode fazê-las aos investigadores responsáveis, Dra. Ana Rosa (+258843122850) e Dra. Filipa Ferreira (+258846983009)**



HOSPITAL CENTRAL DE NAMPULA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA  
INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL

**Estudo do perfil epidemiológico molecular de *Giardia duodenalis* em crianças dos 0 aos 59 meses de idade no Hospital Central de Nampula e sua associação com o estado nutricional, diarreia e VIH.**

**Promotores: Instituto de Higiene e Medicina Tropical e Hospital Central de Nampula**

**FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO INFORMADO**

**Página de assinaturas**

**Nome e assinatura do membro da equipa de estudo que leu e explicou o texto anexo:**

Nome: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

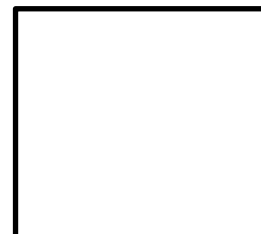
Nome da criança: \_\_\_\_\_

Na qualidade de encarregado de educação ou responsável legal autorizo que o mesmo participe neste estudo

Nome: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_



Testemunha (membro da equipa de estudo, só se aplica se o encarregado de educação ou responsável legal for iletrado):

Nome: \_\_\_\_\_

Cargo (Hospital): \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Local e data, \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

**Investigadores responsáveis: Dra. Ana Rosa (+258843122850) e Dra. Filipa Ferreira (+258846983009)**





## MAKHALELO (ORERIELIWA) WALA OLELIHIWA

**Osoma wottarihela wa shipicho *Giardia duodenalis* anmirimani wanamuane okhuma vanyariwaia m,phaca mieri miloko mithana-misheshe oshiripitali yulupale yawamphula nothucuma -waia wosoma mukhalelo, wovaluwa ni wa sida.**

**Ashinene: Methenqueso woratta ni wecumi tropical ni Hospital Central ya wamphula.**

Ashipicho muiruthuni, mujankiho wekumi yanamuane wa elapo yothene, onraviwaka wamasine wala eyolha yohononeia.

Ashipicho-ala, poti omukhalihaca muaniho owolowasa, ni omphanhahaca eretta yntoko omala ephome,ovaluwasa,ohikhala orathene.Ashipicho-ala akhalana ololiwa-waia wekweia ni wowoniheraja. Muaniho akhala okhalana ashipicho-ala ni khohiloliwa,poti okhumelelamushankiho wun-nua-wawe ni mukhalelo-awe.

**Ethu sheni emphavelahu opaca?**

Yosoma-ela, wiwesheja orattene manera ashipicho -ala ani-wananaia ni ohikhala sana, ovaluwasa ni sida na- namuane vanyariwaia m,pakha mieri miloko mithano na-sheshe hoshiripitali yulophale ya wamphula.

**Ethu sheni kinrowaka opaca para wira m,panttha wosomani?**

Niniphela wovekelani ekuher emosa yaminhoso sulupale ni munihie nimpheme.niniphela-tho mwakulene sokoha m,pantta wempa, wattamela masi ni oratta.sothene sinrowa okushiwa -va sinrowa okhala sawiphini.

**Mireriho shene wosomani?**

Mioniherio yawosomani onrowa onikhalihariwa wiwelela orattene onkumiheriawe ashipicho -ale mweruthuni mukhalelo,eretta yovaluassa ni-sidawa ashinamuaneokhuma vanyariwaia m,pakha mieri miloko mithanu na-misheshe.

Muaniho okhala-wira okhalana ashipicho-ala mweruthuni onrowa ololiwa ni dotoro okhumi (medico) walani infirmero onakhalela.

**Mijankiho sheni sikalenle m,pantha wo wosomani?**

Kiavo yonanara ekhalenle ni ohavuliwawaminhoso sulupale, ephima-phemiwa ni okhanle miteko ohinkumiheriwa owereiwa. Ololiwa tiwarere ni onthowa ololiwa ni nale anvara mitteko so-okumi.

**Kokhala omukhottiha mwanaca wosomani-ola?**

Aiyo poti omukhottiha mwanincho wira m,pantta. Kiavo enkumelela yonanara mwamukhothiha.

**Ethu sheni enrowa opuanha wasomwa -vale?**

Soniheriwa minhoso sulupale ni sinkumelela sa muanincho sinrowa osomiwa ni soniheriwe ni sinrowa oleliheriwa ma-dotoro okumi (medicos) Amulola.

**Muakhalana-tho yokoha yawosomo-la, muakohe alipo ampaca osoma-ola: dotoro Ana Rosa (+258843122850) ni dotoro Filipa Ferreira (+258846983009).**



## MAKHALELO (ORERIELIWA) WALA OLELIHIWA

Osoma wottarihela wa shipicho *Giardia duodenalis* anmirimani wanamuane okhuma vanyariwaia m'phaca mieri miloko mithana-misheshe oshiripitali yulupale yawamphula nothucuma -waia wosoma mukhalelo, wovaluwa ni wa sida.

Ephapelo yothapanha

**Ashinene:** Methenqueso woratta ni wecumi tropical ni Hospital Central ya wamphula.

Nssina anira panthy wa wossoma onmiacansse yolepa:

Nssina: \_\_\_\_\_

Nssina na Muana: \_\_\_\_\_

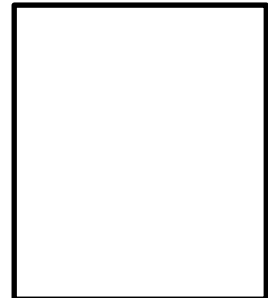
Nssina na Muana: \_\_\_\_\_

Okhala wa muholely wa namassuma nary muholely wokhalela kinninthuniha mussomiakha okhanle panthy wosoma.

Nssina: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Othapanha Nssina: \_\_\_\_\_



Namonetchetcha (anira panthy wa wossoma, enrumeleya akhala muholely wa wossomani nary muholely wokhalela ohynssonme):

Nssina: \_\_\_\_\_

Eylupale (Hospital): \_\_\_\_\_

Othapanha Nssina: \_\_\_\_\_

Opuro ni Nihykho, \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Muakohe alipo ampaca osoma-ola: dotora Ana Rosa (+258843122850) ni dotora Filipa Ferreira (+258846983009).



## **Anexo II**



## 1. INQUÉRITO SÓCIODEMOGRÁFICO

Nº \_\_\_\_\_

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Nome da criança \_\_\_\_\_

Nome do Cuidador \_\_\_\_\_ Grau de Parentesco \_\_\_\_\_

Data de Nascimento da criança \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Sexo: F \_\_\_\_ M \_\_\_\_

Província \_\_\_\_\_

Distrito \_\_\_\_\_

Enfermaria/ Consulta externa \_\_\_\_\_

(Folha sob tutela do médico coordenador)





**Estudo do perfil epidemiológico molecular de *Giardia duodenalis* em crianças dos 0-59 meses de idade no Hospital Central de Nampula e sua associação com o estado nutricional, diarreia e VIH.**

**1. INQUÉRITO SÓCIODEMOGRÁFICO**

Nº \_\_\_\_\_

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Enfermaria/ Consulta externa \_\_\_\_\_

**1.1. Dados da criança**

1.1.1. Data de Nascimento \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

1.1.2. Sexo F\_\_ M\_\_

1.1.3. Província onde reside \_\_\_\_\_

1.1.4. Distrito onde reside \_\_\_\_\_

1.1.5. Grau de parentesco do cuidador \_\_\_\_\_

**1.2. Aleitamento materno**

1.2.1. A criança está a ser amamentada actualmente? Sim ☐ Não ☐ . É exclusivo? Sim ☐ Não ☐

1.2.2. Duração do aleitamento materno exclusivo? \_\_\_\_\_ meses/Não se aplica ☐

1.2.3. Duração total do aleitamento materno? \_\_\_\_\_ meses/Não se aplica ☐

**1.3. Saneamento**

1.3.1. Têm latrina com fossa aberta: Sim ☐ Não ☐

1.3.2. Têm latrina com fossa melhorada: Sim ☐ Não ☐

1.3.2. Têm retrete: Sim ☐ Não ☐ ; Com autoclismo ☐ Sem autoclismo ☐

1.3.3. Têm casa de banho no interior da casa: Sim ☐ Não ☐

1.3.4. Defecam ao ar livre: Sim ☐ Não ☐

1.3.5. Deitam lixo num contentor: Sim ☐ Não ☐

1.3.6. Deitam o lixo ao ar livre: Sim ☐ Não ☐

1.3.7. Deitam lixo ao redor da casa: Sim ☐ Não ☐

**1.4. A água que a criança bebe:**

1.4.1. Canalizada: Sim ☐ Não ☐

1.4.2. Do rio, lago, lagoa: Sim ☐ Não ☐

1.4.3. Do fontenário: Sim ☐ Não ☐

1.4.4. Do poço ou furo: Sim ☐ Não ☐

1.4.5. Outra, qual? \_\_\_\_\_

**1.5. Tratamento da água para beber:**

1.5.1. A água para beber é tratada: Sim ☐ Não ☐

1.5.2. Tratada com lixívia: Sim ☐ Não ☐ ; Quantidade (por litro de água): \_\_\_\_\_

1.5.3. Tratada por fervura: Sim ☐ Não ☐ ; Quanto tempo: \_\_\_\_\_ (minutos)

1.5.4. Outro, qual: \_\_\_\_\_

**1.6. Tipo de habitação**

1.6.1. Moradia: Sim ☐ Não ☐

1.6.2. Apartamento/Flat: Sim ☐ Não ☐

1.6.3. Palhota: Sim ☐ Não ☐

1.6.4. Bloco/Zinco: Sim ☐ Não ☐

1.6.5. Outra, qual? \_\_\_\_\_

**1.7. Caracterização da Família**

1.7.1. Idade completa da mãe \_\_\_\_\_ anos

1.7.2. Idade completa do pai \_\_\_\_\_ anos

1.7.3. Escolaridade em anos completos da mãe: \_\_\_\_\_ anos

1.7.4. Escolaridade em anos completos do pai: \_\_\_\_\_ anos

1.7.5. Actividade profissional do pai: \_\_\_\_\_

1.7.6. Actividade profissional da mãe: \_\_\_\_\_

1.7.7. Quantas pessoas vivem em casa (incluindo a criança) \_\_\_\_\_

1.7.8. Quantos quartos tem a casa: \_\_\_\_\_

## **Anexo III**



**Estudo do perfil epidemiológico molecular de *Giardia duodenalis* em crianças dos 0-59 meses de idade no Hospital Central de Nampula e sua associação com o estado nutricional, diarreia e VIH.**

**2. INQUÉRITO ANTROPOMÉTRICO**

Nº \_\_\_\_\_

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Enfermaria/Consulta Externa \_\_\_\_\_

SINAIS DE DESNUTRIÇÃO SEVERA		
2.1.1. Data de internamento ____/____/____		
2.1.2. Avaliação Antropométrica inicial (Data: ____/____/____)		
2.1.3. Edema?    0    +    ++    +++		
2.1.4. Dermatoses?    0    +    ++    +++ ( <i>rash</i> cutâneo/fissuras)		
<b>2.1.5. Antropometria</b>		
2.1.5.1. Peso no nascimento (g):		
2.1.5.2. Perímetro braquial (cm):		
	Valor	Zscore
2.1.5.3. Peso (g)		
2.1.5.4. Comprimento (0-24 meses)		
Estatuta (25-59 meses) (cm)		
2.1.5.5. IMC (kg/m <sup>2</sup> )		



## **Anexo IV**





**Estudo do perfil epidemiológico molecular de *Giardia duodenalis* em crianças dos 0-59 meses de idade no Hospital Central de Nampula e sua associação com o estado nutricional, diarreia e VIH.**

### 3. INQUÉRITO CLÍNICO

Nº \_\_\_\_\_

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Enfermaria/Consulta Externa \_\_\_\_\_

Quem respondeu ao questionário \_\_\_\_\_

INFORMAÇÕES CLÍNICAS
<b>3.1.1. Hemoglobina (Hb) (g/l):</b>
<b>3.1.2.1. Diarreia:</b> Sim    Não 3.1.2.1.1. Há quantos dias? _____ 3.1.2.1.2. Quantas dejectões por dia? _____ 3.1.2.1.3. Diarreia aquosa?       Sim    Não 3.1.2.1.4. Diarreia com sangue?       Sim    Não 3.1.2.1.5. Diarreia com muco?       Sim    Não 3.1.2.1.6. Nos últimos 3 meses teve diarreia?       Sim    Não 3.1.2.1.6.1. Quantas vezes? _____ 3.1.2.1.6.2. Durou quantos dias? _____ 3.1.2.1.7. Vómitos?       Sim    Não 3.1.2.1.8. Febre?       Sim    Não 3.1.2.1.9. Dor abdominal?       Sim    Não 3.1.2.1.10. Falta de apetite?       Sim    Não 3.1.2.1.11. Tosse?       Sim    Não 3.1.2.1.12. Outro(s): _____
<b>3.1.2.2. Há quanto tempo foi a última desparasitação:</b> 3.1.2.2.1. Medicamento administrado: 3.1.2.2.2. Dose:
<b>3.1.2.3. Patologias associadas</b> 3.1.2.3.1. Anemia - Sim    Não

